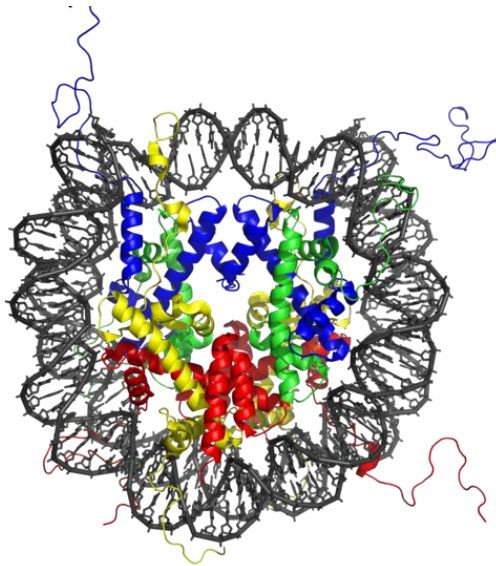


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΥΛΙΚΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ
ΙΣΤΟΝΩΝ



ΤΖΙΑΤΖΟΣ Κ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

1. Παπαγεωργίου Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
2. Δημητρόπουλος Ιωάννης, Καθηγητής Μηχανικών πληροφορικής και Τηλεπικοινωνιών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Μακεδονίας.
3. Πολίτου Αναστασία, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Μέλη εξεταστικής επιτροπής

4. Γεωργάτος Σπυρίδων, Καθηγητής Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
5. Ευαγγελάκης Γεώργιος, Καθηγητής Φυσικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
6. Φωκάς Δημοσθένης, Επίκουρος Καθηγητής Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
7. Λέκκα Χριστίνα, Επίκουρη Καθηγήτρια Μηχανικών Επιστήμης Υλικών Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου, επίκουρο καθηγητή του τμήματος μηχανικών επιστήμης υλικών κ. Δημήτριο Παπαγεωργίου, όπου η πολύτιμες γνώσεις και η ουσιαστική του καθοδήγηση, συνέβαλλε τα μέγιστα και έπαιξε τον καθοριστικότερο ρόλο για την ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Θεωρώ σκόπιμο να ευχαριστήσω την επίκουρο καθηγήτρια της Ιατρικής σχολής κ. Αναστασία Πολίτου, για την συνεισφορά της στο να κατανοήσω την βιολογία του προβλήματος και να αντιμετωπίσω με όσο τον δυνατόν λιγότερες απορίες τα όποια προβλήματα συνάντησα. Θα ήταν παράληψη μου να μην ευχαριστήσω και το τρίτο μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής καθηγητή του τμήματος μηχανικών πληροφορικής και τηλεπικοινωνιών κ. Ιωάννη Δημητρόπουλο, που πρόσφερε με την σειρά του στην διατριβή μου.

Ακόμη ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής όπου με τις παρατηρήσεις και τα εύστοχα σχόλια τους έβαλαν και αυτά ένα λίθο στην ολοκλήρωση της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδάκτορα του πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Παπαμώκο Γεώργιου για την άριστη συνεργασία και την προσφορά του στην εύρεση λύσεως σε διάφορα προβλήματα που εμφανίστηκαν. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κ. Δημακόπουλο Κωνσταντίνο για την αβάρετη βοήθεια του στην αντιμετώπιση προβλημάτων τεχνικής φύσεως, τόσο σε θέματα πού είχαν σχέση με την άρτια λειτουργία του λειτουργικού συστήματος (software), αλλά και του υλικού του ηλεκτρονικού υπολογιστή (hardware), που αποτελούσε και το εργαλείο της έρευνας.

Τέλος το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου, που με την ηθική και όχι μόνο, στήριξη της με βοήθησε στο να μπορέσω να είμαι συγκεντρωμένος στην πραγματοποίηση του σκοπού μου.

Περίληψη

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη βιολογία καθώς ελέγχουν την δυναμική συμπεριφορά της χρωματίνης. Η στρατολόγηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις θεωρείται ότι συνιστά ένα μηχανισμό που ελέγχει τη βιολογική δραστηριότητα. Για παράδειγμα η τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 της ιστόνης H3 επηρεάζει την δέσμευση της ετεροχρωματινικής πρωτεΐνης 1 (HP1) σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος. Παρά την πρόσφατη πρόοδο που έχει επιτευχθεί στο πεδίο η επίδραση και οι υποκείμενοι μηχανισμοί αυτής και πολλών άλλων τροποποιήσεων παραμένουν ακόμη ασαφείς.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε με υπολογιστική προσομοίωση η αλληλεπίδραση της HP1 με την ιστόνη H3 και διερευνήθηκε ο ρόλος συγκεκριμένων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων σε ατομική κλίμακα. Για την περιγραφή του συστήματος χρησιμοποιήθηκε το κλασσικό πεδίο δυνάμεων Amber σε συνδυασμό με τεχνικές προσομοίωσης μοριακής δυναμικής. Οι παράμετροι που απαιτούνται για τα τροποποιημένα αμινοξέα κατασκευάστηκαν με υπολογισμούς πρώτων αρχών.

Εξετάστηκαν 10 περιπτώσεις με διαφορετικούς συνδυασμούς τροποποιήσεων της αργινίνης 8, της λυσίνης 9 και της σερίνης 10 σε κλίμακα χρόνου 1 μ s. Προέκυψε ότι υπάρχει έντονη αλληλεπίδραση μεταξύ της φωσφορυλιωμένης σερίνης 10 και της αργινίνης 8, ενώ όταν απουσιάζει η τροποποίηση, η αλληλεπίδραση αυτή παύει να υφίσταται. Επίσης παρατηρήθηκε ανταγωνιστική δράση του γλουταμικού οξέος 56 της HP1 με την σερίνη 10 και την αργινίνη 8 της H3. Επιπλέον βρέθηκε ότι η διμεθυλίωση της αργινίνης δεν επηρεάζει την συμπεριφορά του συστήματος όταν η K9 και η S10 είναι ήδη τροποποιημένες.

Τέλος μελετήθηκε η επίπτωση των τροποποιήσεων στην αλληλεπίδραση μεταξύ δυο ιστονικών ουρών. Εξετάστηκαν έξι περιπτώσεις με διαφορετικές τροποποιήσεις στην αλληλουχία της ιστονικής ουράς H3. Διαπιστώθηκε ότι η δυναμική συμπεριφορά τους επηρεάζεται έντονα από την παρουσία τροποποιημένων αμινοξέων.

Abstract

Post-translational modifications (PTMs) of histone proteins play an important role in biology since they control the dynamical behavior of chromatin. The recruitment of binding proteins that interact with specific PTMs is believed to comprise a mechanism that controls biological activity. For example trimethylation of lysine 9 in histone H3 influences the binding of heterochromatin protein 1 (HP1) in specific regions of the genome. Despite recent progress that has been achieved in the field, the effect and underlying mechanisms of the aforementioned and many other PTMs is still unclear.

In the present work we study the interaction of HP1 with histone H3 and investigate the effect of specific PTMs using computational simulation methods. For the description of the system we employed the Amber force field combined with molecular dynamics simulation. The required parameters for the modified amino acids were developed by means of ab initio calculations.

We examined 10 different cases with PTMs in Arginine 8, Lysine 9 and Serine 10 for a total simulation time of 1 μ s. It was found that there exists a pronounced interaction between phosphorylated Serine 10 and Arginine 8 in H3, while when this modification is absent the interaction ceases to exist. In addition a competitive action between Glutamic acid 56 in HP1 and Serine 10 or Arginine 8 was observed. Moreover it was found that dimethylation of Arginine 8 does not influence the behavior of the system when K9 and S10 are already modified.

Finally we studied the effect of PTMs in the interaction between two H3 histone tails. Six cases with different modifications were considered. It was found that their dynamical behavior is severely influenced by the presence of modified amino acids.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	10
1.1 Η χρωματίνη	11
1.2 Το νουκλεόσωμα.....	13
1.3 Η υπόθεση του ιστονικού κώδικα.....	14
1.4 Η οικογένεια πρωτεϊνών HP1.....	18
1.4.1 Γενικά.....	18
1.4.2 Σχέσεις δομής και λειτουργίας των πρωτεϊνών HP1.....	19
1.5 Σκοπός της διατριβής.....	23
2. Υπολογιστικές μέθοδοι.....	24
2.1 Πεδία δυνάμεων.....	25
2.1.1 Εισαγωγή.....	25
2.2.3 Το πεδίο δυνάμεων AMBER.....	29
2.3 Η μέθοδος προσαρμογής φορτίων μέσω του ηλεκτροστατικού δυναμικού.....	30
2.4 Ελαχιστοποίηση.....	32
2.4.1 Η μέθοδος της πιο απότομης καθόδου	33
2.4.2 Η μέθοδος συζυγών κλίσεων.....	33
2.5 Μοριακή δυναμική.....	34
2.5.1 Ο αλγόριθμος Verlet.....	36
2.5.2 Περιοδικές συνθήκες.....	36

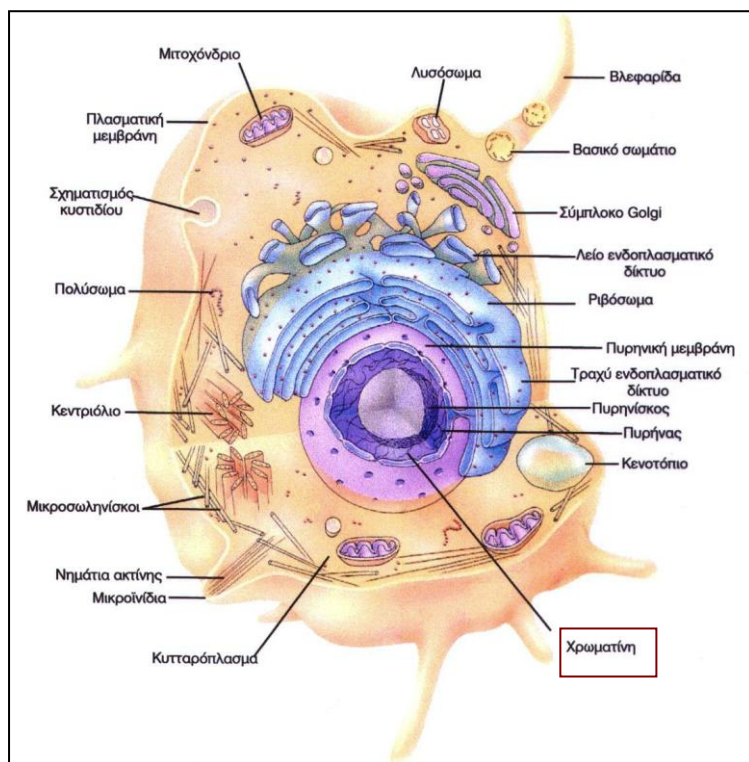
2.5.3 Η μέθοδος Particle Mesh Ewald.....	37
2.5.4 Δυναμική Langevin	41
2.6 Μοντέλα επιδιалύτωσης.....	41
2.6.1 Μοντέλο άμεσης επιδιалύτωσης.....	42
2.6.2 Έμμεση προσομοίωση διαλύτη	45
2.7 Ανάλυση αποτελεσμάτων.....	46
2.7.1 Μέση τετραγωνική μετατόπιση.....	46
2.7.2 Συνάρτηση κατανομής πιθανότητας.....	47
2.7.3 Συνάρτηση σφαιρικής κατανομής	47
2.7.4 Μέση τετραγωνική διακύμανση.....	48
3. Παραμετροποίηση τροποποιημένων αμινοξέων	49
3.1 Υπολογισμός μερικών φορτίων των τροποποιημένων αμινοξέων	50
3.2 Διαμορφωσιακός χώρος των τροποποιημένων αμινοξέων	56
3.2.2 Διαγράμματα Ramachandran	57
4. Το σύστημα HP1-H3	64
4.1 Εισαγωγή.....	65
4.2 Τροποποιήσεις που μελετήθηκαν στο σύστημα HP1-H3.....	66
4.2.1 Κατασκευή του μοντέλου.....	67
4.2.2 Γενικά χαρακτηριστικά των κρυσταλλογραφικών δομών	68
4.3 Αποτελέσματα και συζήτηση.....	74
4.3.1 Τροποποιήσεις της λυσίνης 9 και σερίνης 10	74
4.3.1.1 Δομικά χαρακτηριστικά	74
4.3.1.2 Δεσμοί υδρογόνου.....	85
4.3.2 Τροποποιήσεις της λυσίνης 9 και σερίνης 10 και ταυτόχρονη ασύμμετρη διμεθυλίωση της αργινίνης 8.....	90
4.3.2.1 Δομικά χαρακτηριστικά	90
4.3.2.2 Δεσμοί υδρογόνου	94

4.3.3 Τροποποιήσεις της λυσίνης 9 και σερίνης 10 και ταυτόχρονη μετάλλαξη της αργινίνης 8 σε γλυκίνη	96
4.3.3.1 Δομικά χαρακτηριστικά	96
4.3.3.2 Δεσμοί υδρογόνου	101
5. Το σύστημα H3-H3.....	103
5.1 Εισαγωγή.....	104
5.2 Το σύστημα H3-H3.....	105
5.3 Αποτελέσματα και συζήτηση.....	108
6. Συμπεράσματα	116
Αναφορές	118
Παράρτημα Α.....	130
Παράρτημα Β	133
Παράρτημα Γ.....	137

1. Εισαγωγή

1.1 Η χρωματίνη

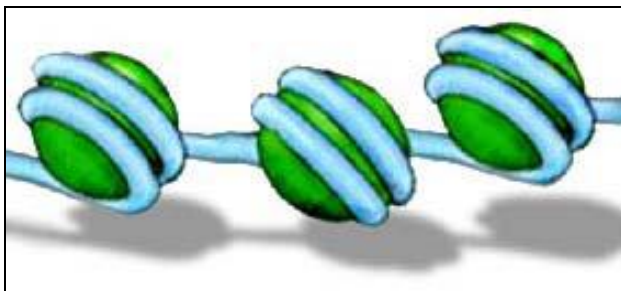
Η Χρωματίνη είναι ένα νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο και αποτελεί μορφή αποθήκευσης του γενετικού υλικού στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων στα χρωμοσώματα (σχ. 1.1). Συνίσταται από DNA, ιστόνες καθώς και από μη ιστονικές πρωτεΐνες. Οι ιστόνες είναι ομάδες πρωτεϊνών πλούσιες σε βασικά αμινοξέα. Η χρωματίνη παρουσιάζεται υπό μορφή κοκκίων ή δισκίων καλουμένων "χρωμομερών" που συνδέονται με λεπτά νήματα τα "χρωμονήματα". Το όνομά της οφείλεται στο γεγονός ότι χρωματίζεται εύκολα από τις χρωστικές ουσίες.



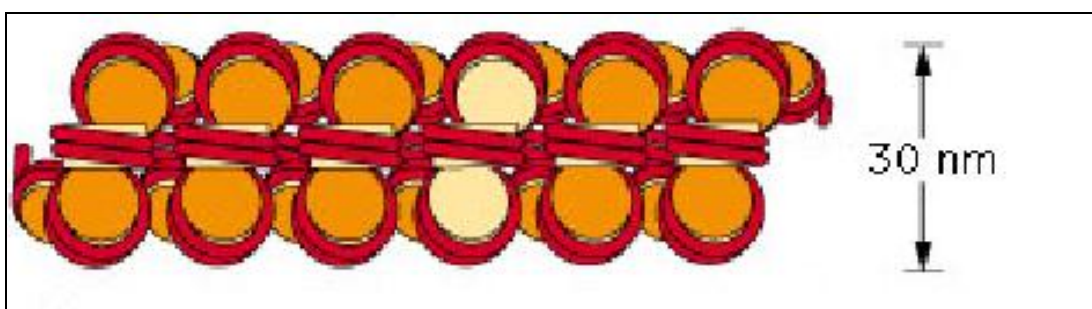
Σχ. 1.1 Τυπικό σχήμα ενός κυττάρου όπου φαίνονται τα συστατικά του.

Ανάλογα με το βαθμό συμπίκνωσής της και το πόσο ενεργή είναι μεταγραφικά, η χρωματίνη διακρίνεται σε ετεροχρωματίνη (ανενεργή και πιο συμπτυκνωμένη) και ευχρωματίνη (ενεργή και λιγότερο συμπτυκνωμένη). Οι όροι ετεροχρωματίνη και ευχρωματίνη ορίστηκαν για πρώτη φορά από τον E. Heitz ως δύο περιοχές του μεσοφασικού πυρήνα που έχουν διακριτή και χαρακτηριστική μορφολογία. Η ετεροχρωματίνη περιέχει ιστόνες οι οποίες είναι συνήθως υπο-ακετυλιωμένες καθώς και

DNA με μεγάλο ποσοστό μεθυλίωσης. Η ετεροχρωματίνη διακρίνεται σε 3 κατηγορίες: στην περικεντρομεριδιακή ή συστατική (constitutive), στην θεμελιώδη (facultative) και την περιφερική ετεροχρωματίνη. Η περιφερική βρίσκεται σε μεγάλο ποσοστό γύρω από τα κεντρομερή και κύριο γνώρισμα της είναι ότι μπορεί να επανέλθει σε μια μεταγραφικά ενεργή κατάσταση. Η περιστασιακή παραμένει ανενεργή και συμπυκνωμένη κατά την διάρκεια της μεσοφάσης σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Τέλος η συστατική ετεροχρωματίνη επενδύει την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη. Μικροσκοπική μελέτη του κυττάρου έχει δείξει ότι κατά το πρώτο επίπεδο συμπύκνωσης της η χρωματίνη οργανώνεται σε δομές που μπορούν να περιγραφούν από τον όρο «χάντρες κομπολογιού» (beads-on-a-string) (σχ. 1.2). Αυτό είναι και το πρώτο στάδιο μιας διαδικασίας που συμπυκνώνει το DNA σε σωληνοειδή πάχους 30 nm (Σχ. 1.3) και τελικά σε δομές υψηλότερης τάξης. Η βασική υπομονάδα της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα.



Σχ. 1.2 Σχηματική αναπαράσταση του beads-on-a-string.

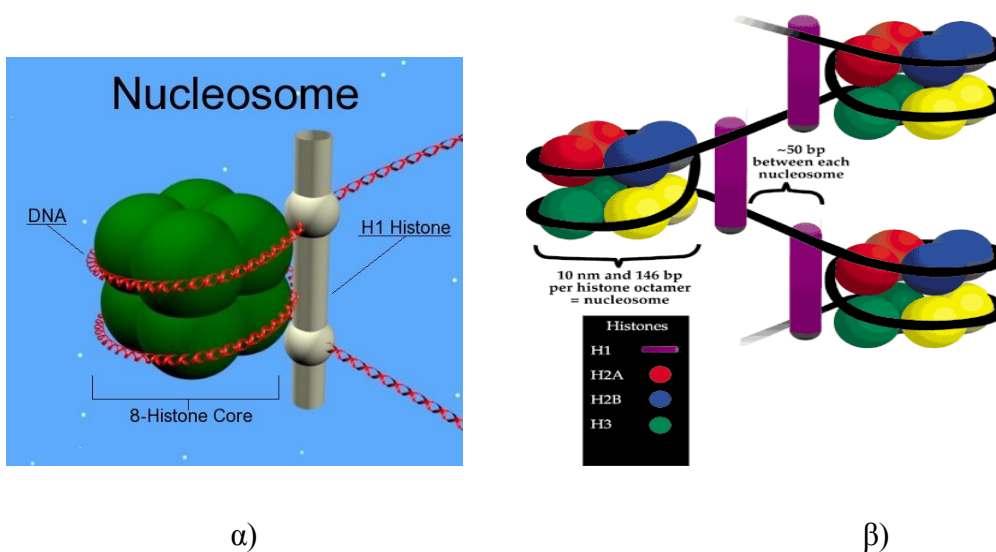


Σχ. 1.3 Σχήμα ενός σωληνοειδούς πάχους 30 nm.

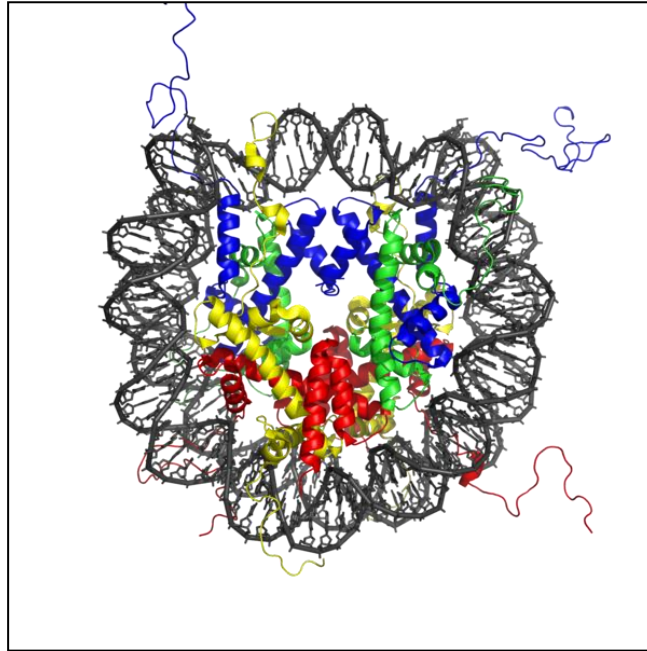
1.2 Το νουκλεόσωμα

Το σώμα (core) του νουκλεοσώματος συγκροτείται από το δμερές των ιστονών 2(H₂A-H₂B-H₃-H₄) που γύρω του τυλίγεται DNA μήκους 147 ζευγών βάσεων (bp) κατά 1_{3/4} στροφές [1,2]. Το πάχος του κάθε νουκλεοσώματος είναι 10nm, γι' αυτό και η παραγόμενη ίνα από τα επαναλαμβανόμενα νουκλεοσώματα κατά μήκος του μη περιτυλιγμένου (linker) DNA έχει ονομαστεί “ίνα των 10nm”. Αυτή η δομή συσπείρωσης παρουσιάζει 7 φορές μειωμένο μήκος, σε σχέση με το γραμμικό B τύπο του DNA. Το μήκος του συνδετικού (linker) DNA έχει μέσο μήκος 60bp, ποικίλει όμως από 8-120bp ανάλογα με τον οργανισμό και τον ιστό. Η συνδετική ιστόνη H1 δένεται στο νουκλεόσωμα στα σημεία που το πάχους 20nm DNA εισέρχεται και εξέρχεται (σχ. 1.4) [3]. Η συνδετική ιστόνη για αρκετά χρόνια θεωρήθηκε απαραίτητη στην αναδίπλωση της χρωματίνης, γεγονός που δεν επαληθεύτηκε από επόμενες *in vitro* μελέτες [4]. Η παρουσία της H1 φαίνεται όμως να είναι απαραίτητη στη δομή της χρωματίνης για άλλους λόγους (ελαχιστοποιεί την ολίσθηση και την κινητικότητα των νουκλεοσωμάτων) [5,6].

Το 1997 δημοσιεύτηκε δομικό μοντέλο που προέκυψε από κρυσταλλογραφικές μελέτες και απεικονίζει την τριτοταγή δομή του νουκλεοσώματος [7] σε ατομική λεπτομέρεια και εξηγεί πως η χρωματίνη υιοθετεί αυτή την διαμόρφωση (σχ. 1.5).



Σχ. 1.4 α) Συσκευασμένο νουκλεοσωμάτιο β) αλληλουχία νουκλεοσωμάτων.



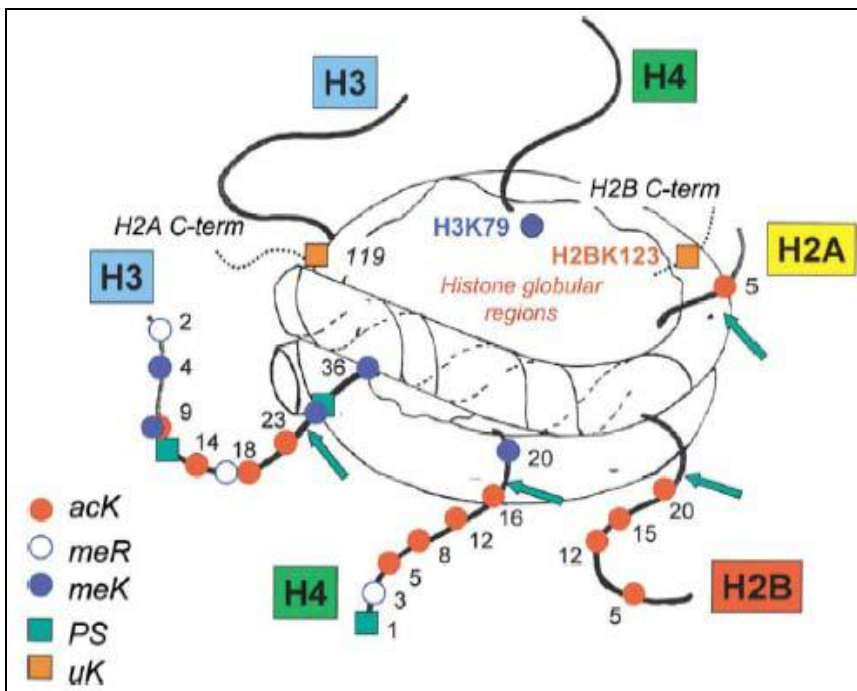
Σχ. 1.5. Μοντέλο της δομής του νουκλεοσώματος, που περιλαμβάνει τις πυρηνικές (core) ιστόνες και το περιελιγμένο DNA.

1.3 Η υπόθεση του ιστονικού κώδικα

Η χρωματίνη είναι το υπόστρωμα μέσα στο οποίο αποθηκεύεται η γενετική πληροφορία. Η ύπαρξη ενός μηχανισμού με τον οποίο γίνεται η αναδιοργάνωση της χρωματίνης είναι κάτι που πλέον δεν αμφισβητείται, μάλιστα πιθανολογείται ότι αυτός ο μηχανισμός είναι και μια πηγή πληροφοριών για την λειτουργία του νουκλεοσώματος. Ο μηχανισμός αναδιοργάνωσης διαμεσολαβείται, μεταξύ άλλων και από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών. Μάλιστα έχει προταθεί ότι υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός από συνδυασμούς αυτών των τροποποιήσεων που συνθέτουν ένα επιγενετικό σύστημα σημάτων που καλείται «ιστονικός κώδικας» και καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την προσβασιμότητα του αντίστοιχου τμήματος του DNA. Πριν ακόμα αναπτυχθεί η θεωρία του ιστονικού κώδικα ήταν γνωστή η ύπαρξη ενζύμων ικανών να καταλύουν μόνο- δι- και τρι- μεθυλίωση καθώς και ακετυλίωση της πλευρικής αμινομάδας της λυσίνης, καθώς και μονομεθυλίωση και συμμετρική και ασύμμετρη διμεθυλίωση της γουανιδινικής ομάδας αργινίνης. Εκτός από τις προαναφερθείσες τροποποιήσεις άλλες βασικές τροποποιήσεις

που απαντώνται σε μια ιστόνη είναι η φωσφορυλίωση, η ουβικουτινιλίωση, η σουμοϋλίωση, η κιτροουλινίωση και η ADP-ριβοςυλίωση (σχ. 1.6).

Δυστυχώς όμως σαφή εικόνα για τα ένζυμα που μπορούν να πραγματοποιήσουν τροποποιήσεις έχουμε μόνο για την ακετυλίωση, όπου καταλύεται από τις Histone Acetyl Transferases (HATs), τη μεθυλίωση από τις Histone Methyl Transferases (HMTs) και τη φωσφορυλίωση από τις ATP-εξαρτώμενες κινάσες [8].



Σχ. 1.6 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που απαντώνται στις ιστόνες [9].

Όμως ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η αποκωδικοποίηση του ιστονικού κώδικα είναι ακόμα πιο πολύπλοκος. Αν ληφθεί υπ' όψιν ότι εντός του νουκλεοσώματος υπάρχουν 8 ιστόνες και οι πιθανές θέσεις των τροποποιήσεων σε μια ιστονική ουρά είναι περισσότερες από μία γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι το φαινόμενο γίνεται αρκετά σύνθετο. Ως παράδειγμα μπορεί να αναφερθεί ότι η μεθυλίωση μόνο των αμινοξικών καταλοίπων της λυσίνης στην ιστόνη H3 μπορεί να δώσει 15×10^3 δυνατούς συνδυασμούς και ο αριθμός όλων των δυνατών τροποποιήσεων της ίδιας ιστόνης ξεπερνάει τους 10^6 συνδυασμούς. Από τα παραπάνω είναι ορατό ότι ακόμα και μικρό ποσοστό αυτών των τροποποιήσεων να μπορεί να πραγματοποιηθεί in vivo δεν είναι εφικτή η «μετάφραση» τους χωρίς την χρήση ειδικών

«αποκωδικοποιητών». Παρόλα αυτά τα τελευταία χρόνια εμφανίζονται μελέτες, που αντιτίθενται με την έως τότε θεώρηση του ιστονικού κώδικα [10,11], που αποτελεί ουσιαστικά μια υπόθεση [12-15]. Η ύπαρξη του είναι πιθανή, αλλά είναι ακόμα ασαφής ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η «αποκωδικοποίηση» του κώδικα.

Δύο μηχανισμοί έχουν προταθεί για τον μηχανισμό αυτό που πιθανόν να δρουν συμπληρωματικά ή ανεξάρτητα. Σύμφωνα με το «δομικό» μοντέλο ο ιστονικός κώδικας μεταφράζεται σε αλλαγές στερεοδιαμορφωτικές ή φορτίου που επηρεάζουν άμεσα την δομή της χρωματίνης. Το «πληροφοριακό» μοντέλο βασίζεται στην υπόθεση ότι ο ιστονικός κώδικας έχει πληροφοριακό περιεχόμενο που βασίζεται κυρίως σε «σήματα» που αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες-τελεστές (effectors).

Οι πρωτεΐνες-τελεστές αποτελούν συνήθως μέρη μεγάλων συμπλόκων και περιέχουν ειδικά μοτίβα, γνωστά με τις ονομασίες bromo-, PHD-, tudor- και chromo domains.

Τα bromodomains απαντώνται σε πολλά σύμπλοκα σχετιζόμενα με την ακετυλίωση των ιστονών κατά την αναδιοργάνωση της χρωματίνης ή σε μεταγραφικούς παράγοντες. Τα bromodomains παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο για την αποτελεσματική ενεργοποίηση πολλών γονιδίων, καθώς φέρονται να αναγνωρίζουν ακετυλιωμένες λυσίνες των ιστονών.

Τα PHD domains βρίσκονται σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς και αποτελούν θέσεις όπου γίνεται η σύνδεση των ιόντων Zn^{2+} . Μάλιστα έχει βρεθεί ότι ένας μεγάλος αριθμός από πυρηνικές πρωτεΐνες διαθέτει PHD domains [16].

Τα chromodomains απαντώνται κυρίως σε πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αναδιοργάνωση της χρωματίνης. Το chromodomain έχει πολύ μικρό μέγεθος, περίπου 55 αμινοξέα, αλλά παρόλα αυτά έχει βρεθεί ότι παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης. Τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα πρωτεϊνών που περιέχουν chromodomains είναι η Heterochromatin protein 1 (HP1) [17] και η Polycomb (Pc) [18].

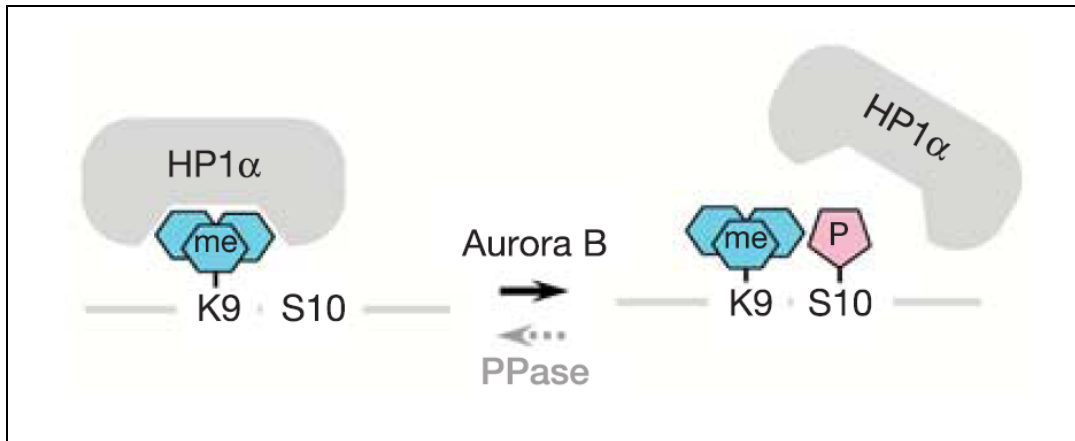
Το chromodomain της HP1 αλληλεπιδρά με την μεθυλιωμένη λυσίνη 9 της ιστόνης H3. Η μεθυλίωση της λυσίνης 9 καταλύεται από έναν αριθμό διαφορετικών ενζύμων όπως είναι Suv39h, η G9a, η ESET, και η GLP/Eu-HMTase1. Όλα τα παραπάνω ένζυμα περιέχουν τμήμα SET που θεωρείται απαραίτητο για την ειδική μεθυλίωση της λυσίνης.

Το chromodomain της Polycomb αλληλεπιδρά με την μεθυλιωμένη λυσίνη 27 της ιστόνης H3. Ο μηχανισμός αυτός έχει βρεθεί ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αποσιώπηση ομοιοτικών γονιδίων κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Ακόμη έχει παρατηρηθεί ότι ο βαθμός σταθερότητας της πρόσδεσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την φύση της τροποποίησης. Πιο συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι το chromodomain της Pc συνδέεται 5 φορές ισχυρότερα όταν η «ουρά» της H3 τριμεθυλιώνεται από ότι όταν η αντίστοιχη περιοχή υποστεί δι- ή μόνο- μεθυλίωση.

Τα Tudor domains είναι παρόμοια σε αλληλουχία με τα chromodomain και θεωρούνται ότι διαθέτουν και αυτά ικανότητα πρόσδεσης σε μεθυλιωμένα υποστρώματα.

Τέλος θεωρείται σκόπιμο να αναφερθεί ότι έχουν αναπτυχθεί κυρίως 2 θεωρίες σύμφωνα με τις οποίες μπορούν να «διαβαστούν» πολλαπλές τροποποιήσεις. Η πρώτη θεωρία κάνει λόγο για την υπόθεση των τοπικών δυαδικών διακοπών (γνωστών στην βιβλιογραφία ως local binary switches) και η δεύτερη για διακριτές μονάδες πληροφοριών που διαμεσολαβούν συγκεκριμένα σήματα (modification cassettes).

Σύμφωνα με την πρώτη θεωρία η φωσφορυλίωση μιας θέσης όταν βρίσκεται γειτονικά σε μία μεθυλιωμένη λυσίνη μπορεί να λειτουργήσει ανταγωνιστικά. Παίζει δηλαδή το ρόλο ενός «διακόπτη» που συνδέει και αποσυνδέει τον τελεστή που συνδέεται. Ένας χαρακτηριστικός διακόπτης είναι ο “methyl/phos switch” στις θέσεις K9/S10 της ιστόνης H3 [19]. Σύμφωνα με κάποιες μελέτες η φωσφορυλίωση στην σερίνη 10 της H3 στο σύστημα HP1-H3 αναστέλλει την μεθυλίωση της λυσίνης 9 και αντίστροφα (σχ. 1.7) [20-22]. Ακόμα μερικά in vitro πειράματα έδειξαν ότι chromodomains παρουσιάζουν απώλεια της σύνδεσης σε διπλά τροποποιημένα πεπτίδια που περιέχουν μεθυλίωση της λυσίνης 9 και φωσφορυλίωση της σερίνης 10.



Σχ. 1.7 Σχηματική αναπαράσταση όπου διακρίνεται ο τοπικός δυαδικός διακόπτης [23].

Σύμφωνα με την δεύτερη θεωρία, του modification cassettes, αυτές οι μονάδες πληροφοριών επηρεάζουν την αναγνώριση και την πρόσδεση πιθανών μορίων τελεστών. Τέτοιες μικρές «κασσέτες» μπορούμε να συναντήσουμε στις ουρές της H3 και της H4.

1.4 Η οικογένεια πρωτεϊνών HP1

1.4.1 Γενικά

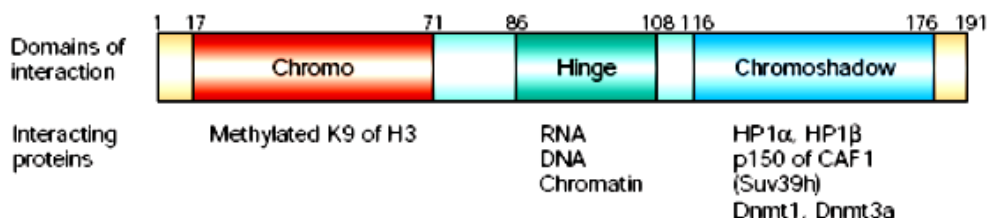
Η οικογένεια των πρωτεϊνών HP1 είναι μια κατηγορία σημαντικών πρωτεϊνών, κυρίως επειδή αυτές οι πρωτεΐνες διαδραματίζουν ρόλο στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης. Έχει βρεθεί ότι η υπερέκφραση της HP1 μπορεί να ενισχύσει το φαινόμενο επίδρασης θέσης (Position Effect Variegation-PEV) [24,25]. Το φαινόμενο PEV περιγράφεται από την εκλεκτική αποσιώπηση ενός μεταγραφικά ενεργού γονιδίου, λόγω μετακίνησής του από την ευχρωματίνη σε μία ετεροχρωματινική περιοχή. Οι πρωτεΐνες HP1 αναγνωρίστηκαν αρχικά στη *Drosophila* και συναντώνται σε 3 ισομορφές, την HP1α, HP1β και HP1γ.

Οι HP1 έχουν μελετηθεί συστηματικά στη *D. melanogaster*, τον *S. pombe* και το ποντίκι. Χαρακτηριστικό παράδειγμα του φαινομένου στη *D. melanogaster* είναι η μεταφορά του γονιδίου *white*. Το 1930, ο Hermann Müller περιέγραψε μεταλλαγμένα στελέχη στη *Drosophila* που είχαν προκύψει από ακτινοβολία με ακτίνες X που παρουσίαζαν μωσαϊκή

έκφραση του γονιδίου *white* στα μάτια. Η αποσιώπηση του γονιδίου *white*, του οποίου η έκφραση σε κάθε ομματίδιο οδηγεί στην ομοιόμορφη κόκκινη χρώση στις φυσιολογικές μύγες, βρέθηκε ότι συνδέεται με την μετατόπιση του γονιδίου *white* από τη φυσιολογική του ευχρωματινική θέση στην περιοχή του κεντρομεριδίου. Οι λευκές περιοχές αντιστοιχούσαν σε κύτταρα στα οποία το γονίδιο είχε απενεργοποιηθεί λόγω «ετεροχρωματινοποίησης». Παρατηρήθηκε ότι το PEV μπορεί να ενισχυθεί (αύξηση των λευκών περιοχών), ή να κατασταλεί (επανεμφάνιση του φυσιολογικού κόκκινου χρώματος) από άλλες μεταλλάξεις. Έτσι, επειδή η υπερέκφραση της HP1 είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση του φαινομένου PEV, δημιουργήθηκε η βάσιμη υποψία ότι η πρωτεΐνη αυτή διαδραματίζει έναν αποσιωποητικό γενικά ρόλο [24]. Πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η αρχικές υποψίες ήταν βάσιμες και βρέθηκε περιοχή με αξιοσημείωτη ομολογία με την PC πρωτεΐνη στην *Drosophila* που ελέγχει την αποσιώπηση ομοιοτικών γονιδίων [26]. Νεότερα όμως αποτελέσματα έδειξαν ότι είναι πιθανόν σε κάποιες περιπτώσεις οι πρωτεΐνες HP1 να ενισχύουν και την μεταγραφική ενεργοποίηση.

1.4.2 Σχέσεις δομής και λειτουργίας των πρωτεϊνών HP1

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η HP1 συναντάται σε 3 ισομορφές, με κύριο γνώρισμα τους την κοινή μοριακή αρχιτεκτονική. Στην αρχιτεκτονική αυτή διακρίνονται 3 περιοχές. Ο χρωμοτομέας (chromodomain, CD) στο αμινοτελικό άκρο, η ενδιάμεση ευέλικτη περιοχή (hinge) και ο «σκιάδης χρωμοτομέας» (chromoshadow domain, CSD) στο καρβοξυτελικό άκρο (σχ. 1.8).



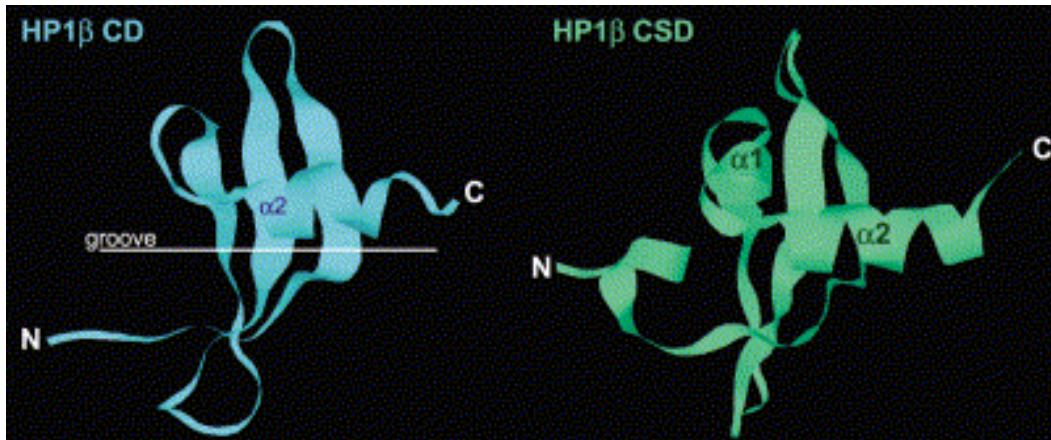
Σχ. 1.8 Οι 3 περιοχές της πρωτεΐνης HP1. CD (κόκκινο), Hinge (πράσινο) και CSD (μπλε), και οι αντίστοιχοι παράγοντες με τους οποίους αλληλεπιδρούν (interaction partners) [27].

Ο χρωμοτομέας αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα των λεγόμενων χρωμοπρωτεϊνών. Η δομή είναι πολύ καλά συντηρημένη και έχει προσδιοριστεί με μέθοδο NMR και με κρυσταλλογραφία ακτίνων X [17,35,123]. Παρατηρώντας τα χαρακτηριστικά του χρωμοτομέα μπορούμε να διακρίνουμε ότι έχει σφαιροειδές σχήμα με διάμετρο 30 Å, που δημιουργείται από μια διάταξη β-πτυχωτής επιφάνειας έναντι μιάς α-έλικας (βλέπε σχήμα 1.9 α2) [17,28]. Η εσωτερική πλευρά της β-πτυχωτής επιφάνειας έχει σχήμα αύλακας και αποτελείται από μη πολικά αμινοξέα.

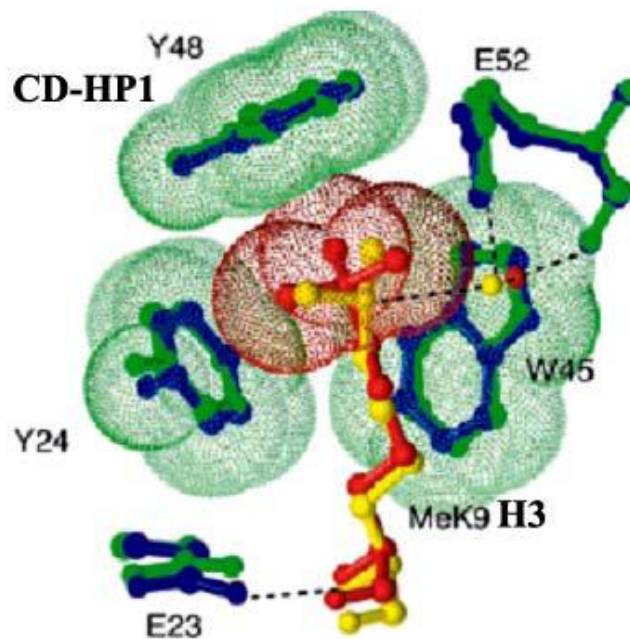
Ο σκιάδης χρωμοτομέας (CSD) είναι μια επίσης αρκετά συντηρημένη δομή που παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με τον χρωμοτομέα με σημαντική διαφοροποίηση ότι η εσωτερική πλευρά (περιοχή αύλακα στο σχήμα 1.9) δεν είναι προσβάσιμη λόγω παρεμποδίσεων από γειτονικά αμινοξέα [28].

Παρατηρώντας τις δομές στις περιοχές CD και CSD είμαστε σε θέση να διακρίνουμε την ομοιότητα τους (σχήμα 1.9), ενδεικτική ότι προήλθαν από το διπλασιασμό ενός προδρόμου γονιδίου. Παρόλα αυτά η κάθε περιοχή εξυπηρετεί διαφορετικές λειτουργίες. Πιο συγκεκριμένα η περιοχή CD ευθύνεται για την αλληλεπίδραση του μορίου με την χρωματίνη ενώ η CSD για το διμερισμό της HP1 και αντιπροσωπεύει μία πλατφόρμα αλληλεπιδράσεων με πυρηνικούς συνοδούς, παράγοντες αναδιαμόρφωσης χρωματίνης (remodeling factors) και ένζυμα που τροποποιούν τις ιστόνες [29,30]. Είναι προφανές ότι και οι 2 περιοχές παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο μέσα στην πρωτεΐνη HP1. Ενδεικτικά μπορεί ναδειχθεί ότι απουσία της περιοχής CD, ή η μετάλλαξή της, οδηγεί σε αποσύνδεση της HP1 από την κεντρομεριδιακή ετεροχρωματίνη [31]. Επίσης έχει βρεθεί ότι η θέση στην οποία θα εντοπιστούν οι διάφορες ισομορφές εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την τροποποίηση του περιβάλλοντος που βρίσκονται. Για παράδειγμα όταν πραγματοποιηθεί τροποποίηση της K9 της H3, συγκεκριμένα γίνει τρι-μεθυλιωσή της, τότε βλέπουμε η HP1α/HP1β σε πολύ μεγάλο βαθμό να συνεντοπίζονται με την K9me3-H3 [32,33], ενώ όταν απαλειφθούν τα SUV39H1/H2 που ευθύνονται για την τροποποίηση, οι θέσεις των εν λόγω ισομορφών δεν μπορούν να καθοριστούν με βεβαιότητα. Για την ακρίβεια *in vitro* πειράματα έδειξαν ότι πεπτίδια τριμεθυλιωμένα στη λυσίνη 9 της ιστόνης H3, καθώς και η ενδογενής ιστόνη H3, μπορούν να συνδεθούν με την HP1, ενώ όταν δεν υφίσταται αυτή η τροποποίηση δεν εμφανίζεται αυτή η ιδιότητα [34-37]. Ο λόγος για τον οποίο συμβαίνει αυτό είναι ότι η HP1 σχηματίζει έναν «κλωβό» αποτελούμενο από τρία αρωματικά υδρόφοβα αμινοξέα (δύο αμινοξέα τυροσίνης και ένα τρυπτοφάνης) μέσα στον οποίο

«εγκλωβίζεται» η τροποποιημένη λυσίνη της ιστόνης H3 και δημιουργεί τη σύνδεση στη περιοχή CD (σχ. 1.9, 1.10).



Σχ. 1.9 Σύγκριση της δομής του χρωμοτομέα (CD) με το σκιάδη χρωμοτομέα (CSD). Η δομή του CSD παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με την CD. Μόνη διαφορά ότι έναντι της β-πτυχής τοποθετούνται 2 α-έλικες (α1,α2) [28].



Σχ. 1.10 Σχηματικό στερεοδιάγραμμα που απεικονίζει τη διμεθυλιωμένη λυσίνη 9 της ιστόνης H3 (κίτρινο) και την τριμεθυλιωμένη λυσίνη 9 (κόκκινο) στο σύμπλοκο με τον χρωμοτομέα(CD) της HP1 (μπλε και πράσινο, αντίστοιχα) [35].

Βέβαια στην πραγματικότητα ο μηχανισμός σύνδεσης της HP1 με την H3 δεν είναι τόσο αποσαφηνισμένος. Όπως προκύπτει από μελέτες σε διάφορους οργανισμούς, κυτταρικούς τύπους και χρωμοσωμικά παρασκευάσματα, δεν παρατηρείται πάντα συνεντοπισμός της HP1 με την τριμεθυλιωμένη λυσίνη της H3 [15,38]. Από την άλλη, χαρτογράφηση αυτών των περιοχών στη *Drosophila* κατέδειξε διακριτές θέσεις πρόσδεσης [11,39,40]. Επίσης άλλη μία σημαντική απόδειξη για την πολυπλοκότητα του συστήματος είναι ότι έχει βρεθεί σε πολλές περιπτώσεις το ένζυμο SUV39H1/H2 να μην είναι μοναδική αιτία αποσύνδεσης της HP1 από την H3, αλλά αυτή να παρατηρείται ακόμα και όταν απουσιάζουν άλλοι παράγοντες όπως είναι η ORC2 (Origin Recognition Complex 2) ή το RNA [41-45]. Ακόμα έχει εντοπιστεί *in vitro*, σε κάποιες περιπτώσεις, και μια αλληλεπίδραση της HP1 με μη μεθυλιωμένη ιστόνη H3 και με «γυμνό DNA» [46-48]. Από τα παραπάνω γίνεται άμεσα αντιληπτό ότι η μεθυλίωση της K9 στην ιστόνη H3 δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας που ευθύνεται για την δέσμευση της H3 στην HP1, αλλά απαιτείται και κάποιο υποακετυλιωμένο περιβάλλον και η συμβολή κάποιου είδους RNA που δεν έχει χαρακτηριστεί ακόμα [42].

Ο διμερισμός της HP1 πραγματοποιείται λόγω της ύπαρξης της περιοχής CSD και μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό είτε ομο- ή ετεροδιμερών. Επίσης η CSD συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις της HP1 με διάφορες πυρηνικές πρωτεΐνες εκτός των ιστονών.

Η ενδιάμεση περιοχή (*hinge*), αποτελεί ένα μη δομημένο και ευέλικτο τμήμα που βρίσκεται ανάμεσα στις περιοχές CD και CSD. Πρόκειται για εύκαμπτη περιοχή που είναι εκτεθειμένη στην επιφάνεια του μορίου. Κύριο γνώρισμα της είναι ότι δεν παρουσιάζει μεγάλο βαθμό ομολογίας ανάμεσα στις διάφορες πρωτεΐνες της HP1. Είναι ενδεικτικό ότι η μόνη συντηρημένη αλληλουχία που απαντάται στην περιοχή αυτή είναι ένα τμήμα βασικών αμινοξέων, το οποίο συνιστά ένα σήμα εισόδου στον πυρήνα (Nuclear Localization Signal, NLS). Σε αντίθεση με τη CD και τη CSD, δεν έχουν βρεθεί πολλές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την HP1 μέσω του *hinge*. Μία πρωτεΐνη που φαίνεται ότι συνδέεται σε αυτό το τμήμα είναι η INCENP (Inner Centromere Protein) που αλληλεπιδρά ειδικά με την ανθρώπινη HP1α [49]. Ακόμη έχει προταθεί και μια αλληλεπίδραση της περιοχής *hinge* με RNA [43]. Άλλο ένα γνώρισμα της περιοχής *hinge* άξιο αναφοράς είναι ότι εμφανίζονται, εντός αυτής της περιοχής αλληλουχίες θέσεων φωσφορυλίωσης από πολλές κινάσες [50]. Το παραπάνω γνώρισμα αυξάνει σε μεγάλο βαθμό την πιθανότητα η δραστηριότητα της

CD και της CSD να επηρεάζεται από την φωσφορυλίωση που συμβαίνει στη περιοχή hinge.

1.5 Σκοπός της διατριβής

Είναι εμφανές από τα παραπάνω ότι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών παίζουν καθοριστικό ρόλο στον τρόπο που θα εκφράζονται ή όχι τα γονίδια. Παρά την εκτενή όμως μελέτη των τροποποιημένων αμινοξέων με *in vivo* και *in vitro* μεθόδους σε μεγάλο αριθμό συστημάτων, η υπολογιστική μελέτη αυτών είναι εξαιρετικά περιορισμένη.

Στη παρούσα διατριβή μελετάται σε ατομικό επίπεδο η αλληλεπίδραση της ετεροχρωματινικής πρωτεΐνης 1 (HP1) με την ιστόνη H3 υπό την παρουσία ενός πλήθους διαφορετικών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Η μελέτη εστιάζει στην συμπεριφορά και στις αλλαγές που επάγονται στα δομικά χαρακτηριστικά από τις διαφορετικές τροποποιήσεις. Ειδικότερα δίνεται έμφαση στη μεθυλίωση της λυσίνης 9 και στη φωσφορυλίωση της σερίνης 10 της ιστόνης H3.

Επιπλέον μελετάται η αλληλεπίδραση μεταξύ τμημάτων δύο ιστονικών ουρών ως ένα μοντέλο για τις δια- ή ενδο- νουκλεοπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και πάλι υπό την παρουσία διαφορετικών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων.

2. Υπολογιστικές μέθοδοι

2.1 Πεδία δυνάμεων

2.1.1 Εισαγωγή

Η συντριπτική πλειοψηφία των προβλημάτων που έχει να κάνει με βιολογικά συστήματα περιέχει μεγάλο αριθμό ατόμων και κατ' επέκταση ηλεκτρονίων και η εξέταση, ενός τέτοιου συστήματος με υπολογισμούς πρώτων αρχών ακόμα και με ημι-εμπειρικές μεθόδους όπου οι αλληλεπιδράσεις ορισμένων ηλεκτρονίων αγνοούνται, καθίσταται πρακτικά αδύνατη. Για τη μελέτη τέτοιων συστημάτων χρησιμοποιούνται κλασσικά πεδία δυνάμεων (force fields), που δεν λαμβάνουν υπόψιν τους την ηλεκτρονιακή δομή, ενώ η ενέργεια του συστήματος καθορίζεται μόνο από τις θέσεις των πυρήνων και δίνεται από κλασσικές αλληλεπιδράσεις. Η μεθοδολογία αυτή ονομάζεται μοριακή μηχανική και σε αρκετές περιπτώσεις μπορεί να δώσει αποτελέσματα όσον αφορά την δομή ίδιας ακριβείας με υπολογισμούς υψηλού επιπέδου κβαντικής μηχανικής. Ωστόσο δεν μπορεί να δώσει αποτελέσματα που αφορούν ηλεκτρονιακές ιδιότητες.

Ένα τυπικό πεδίο δυνάμεων, που χρησιμοποιείται σε προσομοιώσεις βιολογικών συστημάτων έχει 5 όρους που δείχνουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ συνδεδεμένων ατόμων, μεταξύ γωνιών και μεταξύ διέδρων γωνιών. Επιπλέον περιέχει αλληλεπιδράσεις Van Der Waals και αλληλεπιδράσεις ηλεκτροστατικής φύσεως (σχ. 2.1). Η μορφή ενός τυπικού πεδίου δυνάμεων που χρησιμοποιείται σε βιολογικά συστήματα δίνεται παρακάτω:

$$V(r) = \sum_{bonds} k_b (l - l_0)^2 + \sum_{angles} k_a (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{torsions} \frac{1}{2} V_n [1 + \cos(n\omega - \gamma)] + \sum_{atompairs} \left[\frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right] + \sum_{atompairs} \left[\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right] \quad \text{Εξ. 1}$$

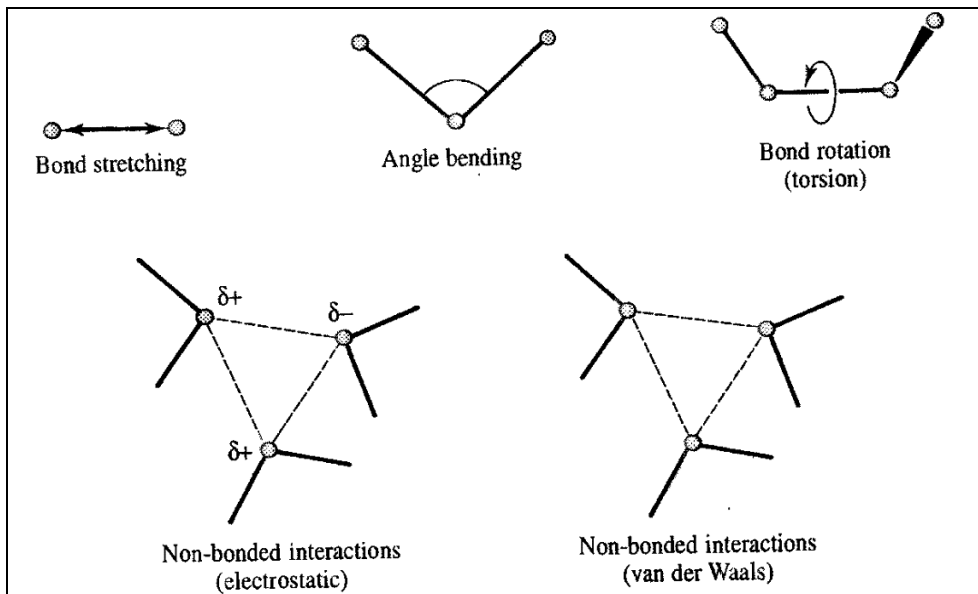
Ο πρώτος όρος εκφράζει την ενέργεια που απαιτείται έτσι ώστε ο δεσμός μεταξύ δυο ατόμων να παραμορφωθεί από το μήκος ισορροπίας. Η σταθερά k_b εξαρτάται από το είδος των ατόμων και τον τύπο του δεσμού μεταξύ τους.

Ο δεύτερος όρος αντιπροσωπεύει την ενέργεια που απαιτείται έτσι ώστε η γωνία που σχηματίζουν τρία συνδεδεμένα άτομα (Σχ. 2.1) να παραμορφωθεί από την γωνία ισορροπίας θ_0 . Η σταθερά k_a και σε αυτόν τον όρο εξαρτάται από το είδος των ατόμων και τον τύπο των δεσμών μεταξύ τους.

Ο τρίτος όρος αντιπροσωπεύει την ενέργεια που απαιτείται για περιστροφή γύρω από ένα δεσμό, όπου V_n είναι το ύψος του εμποδίου (barrier) κατά την περιστροφή. Ανάλογα με τα άτομα που σχηματίζουν την αντίστοιχη δίεδρη γωνία ω είναι πιθανό να υπάρχουν περισσότερα από ένα ελάχιστα (και αντίστοιχα εμπόδια) κατά την διάρκεια μια πλήρους περιστροφής 360 μοιρών.

Ο τέταρτος όρος αντιπροσωπεύει αλληλεπιδράσεις μεταξύ φορτίων που θεωρούνται τοποθετημένα στις θέσεις των πυρήνων και ονομάζονται μερικά ατομικά φορτία (partial atomic charges). Οι τιμές των φορτίων καθορίζονται από το μοντέλο έτσι ώστε το σύνολο τους να αναπαράγει το πραγματικό ηλεκτροστατικό δυναμικό του συστήματος, όπως αυτό προσδιορίζεται από υπολογισμούς πρώτων αρχών. q_i και q_j είναι τα μερικά ατομικά φορτία των αλληλεπιδρώντων ατόμων, ενώ r_{ij} είναι η απόσταση μεταξύ τους και ϵ_0 είναι η σταθερά Coulomb.

Ο πέμπτος όρος αντιπροσωπεύει τις αλληλεπιδράσεις Van Der Waals μεταξύ όλων των ζευγαριών ατόμων. Ο βασικός λόγος για τον οποίο εισήχθησαν οι αλληλεπιδράσεις Van Der Waals είναι ότι οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μόνες τους δεν επαρκούν για την περιγραφή του συστήματος. Στον όρο αυτό βλέπουμε ότι έχουμε ελκτικές και απωστικές, διατομικές δυνάμεις με την μορφή δυναμικού Lennard-Jones 12-6.



Σχ. 2.1 Σχηματικές αναπαραστάσεις των 5 όρων σε ένα πεδίο δυνάμεων.

Τα πιο γνωστά πεδία δυνάμεων που έχουν αναπτυχθεί είναι η οικογένεια δυναμικών MM (MM2, MM3, MM4), το CHARMM και το AMBER, το οποίο ήταν και το δυναμικό που χρησιμοποιήθηκε στους υπολογισμούς της παρούσας διατριβής.

Το δυναμικό MM2 αναπτύχθηκε για προσομοιώσεις οργανικών κυρίως μορίων μικρού μεγέθους [51-54]. Η ενέργεια δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$\begin{aligned}
 V(r) = & \sum_{bonds} \frac{1}{2} k_b (l - l_0)^2 [1 - 2(l - l_0)] + \\
 & \sum_{angles} \frac{1}{2} k_a (\theta - \theta_0)^2 [1 + 7 \cdot 10^{-8} (\theta - \theta_0)^4] + \\
 & \sum_{str-bend} \left[\frac{1}{2} k_{sb} [(l - l_0) + (l' - l'_0)] (\theta - \theta_0) \right] + \\
 & \sum_{torsions} \left[\frac{1}{2} V_1 [1 + \cos(\phi)] + \frac{1}{2} V_2 [1 + \cos(2\phi)] + \frac{1}{2} V_3 [1 + \cos(3\phi)] \right] + \\
 & \sum_{atompairs} \frac{\mu_i \mu_j}{\epsilon r^3} (\cos \chi - 3 \cos a_i \cos a_j) + \sum_{atompairs} A_{ij} e^{-B_{ij} r_{ij}} - \frac{C_{ij}}{r_{ij}^6}
 \end{aligned}$$

Ο πρώτος όρος εκφράζει τη συνεισφορά λόγω της παραμόρφωσης δεσμών, ενώ ο δεύτερος εκφράζει τη συνεισφορά λόγω της παραμόρφωσης της γωνίας που σχηματίζουν τρία άτομα. Το MM2 περιέχει επιπλέον όρους που εκφράζουν τη συνεισφορά λόγω ταυτόχρονης παραμόρφωσης της γωνίας και του μήκους των δεσμών (stretch-bend). Η συνεισφορά στην ενέργεια λόγω περιστροφής γύρω από ένα δεσμό εκφράζεται από τον τέταρτο όρο, ενώ οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις περιγράφονται ως αλληλεπιδράσεις μεταξύ φορτισμένων διπόλων και δίνονται από τον πέμπτο όρο. Ο τελευταίος όρος περιγράφει τις αλληλεπιδράσεις Van der Waals. Τα δυναμικά MM3 και MM4 [55-59] αποτελούν βελτίωση του δυναμικού MM2 και οι εξισώσεις που τα περιγράφουν είναι παρόμοιες με αυτές του MM2.

Το δυναμικό CHARMM [60-62] δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$\begin{aligned}
 V(r) = & \sum_{bonds} k_b (l - l_o)^2 + \sum_{angles} k_a (\theta - \theta_o)^2 + \sum_{torsions} \frac{1}{2} V_n [1 + \cos(n\omega - \gamma)] + \\
 & \sum_{angles} k_a (\omega - \omega_o)^2 + \sum_{urey-bradley} k_u (u - u_o)^2 + \\
 & \sum_{atompairs} \left[\frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right] + \sum_{atompairs} \left[\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right]
 \end{aligned}$$

Το δυναμικό Charmm περιέχει επιπλέον όρους για την παραμόρφωση εκτός επιπέδου ($\omega - \omega_0$) και επιπλέον συνεισφορές τύπου Urey-Bradley ($u - u_0$) για την παραμόρφωση της γωνίας μέσω 1,3 μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων.

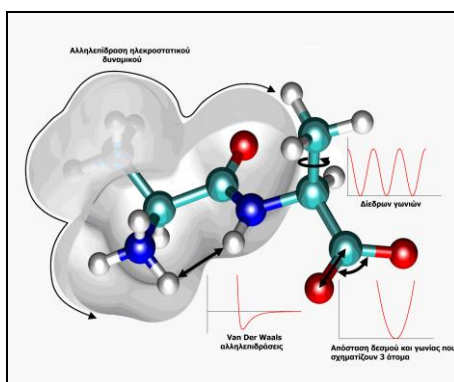
2.2.3 Το πεδίο δυνάμεων AMBER

Για τους υπολογισμούς στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε το πεδίο δυνάμεων AMBER [63,64]. Η εξίσωση που το περιγράφει είναι η ακόλουθη:

$$V(r) = \sum_{bonds} k_b (l - l_0)^2 + \sum_{angles} k_a (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{torsions} \frac{1}{2} V_n [1 + \cos(n\omega - \gamma)] + \sum_{atompairs} \left[\frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right] + \sum_{atompairs} \left[\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right]$$

Οι όροι της παραπάνω εξίσωσης ταυτίζονται με τους όρους που περιγράφουν την γενική εξίσωση που περιγράφει τα πεδία δυνάμεων (εξ. 1). Ως εκ τούτου και ο κάθε όρος που περιγράφει το δυναμικό AMBER θα εκφράζει ότι και ο καθένας από τους όρους που περιγράφουν την εξ. 1.

Στον πίνακα 2.1 φαίνεται η ενεργειακή συνεισφορά του κάθε όρου που περιγράφει το δυναμικό αλληλεπίδρασης. Από τον πίνακα αυτό είναι εμφανές ότι οι δεσμικές αλληλεπιδράσεις είναι αυτές που συνεισφέρουν περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη αλληλεπίδραση στον καθορισμό της ενέργειας και γενικότερα οι δεσμικές αλληλεπιδράσεις είναι τουλάχιστον μια τάξη μεγαλύτερες από τις μη-δεσμικές κατά τον καθορισμό της ενέργειας του μορίου.



Σχ.2.2 Αναπαράσταση ενός οργανικού μορίου που απεικονίζονται όλες οι αλληλεπιδράσεις που λαμβάνονται υπ' όψιν κατά την μελέτη του με χρήση πεδίων δυνάμεων.

Ενεργειακή συνεισφορά	Κλίμακα (Kcal/mol)
Δεσμού	100
Γωνίες	10
Διέδρης γωνίας	1
Ηλεκτροστατική	0.5
Van Der Waals	0.1

Πίνακας 2.1: Εκτίμηση της ενεργειακής συνεισφοράς κάθε όρου ενός πεδίου δυνάμεων.

Στο σχήμα 2.2 φαίνεται ένα παράδειγμα ενός τυπικού οργανικού μορίου, πως διατάσσονται οι όροι του δυναμικού αλληλεπίδρασης και πως αναπαριστάται γραφικά ο κάθε όρος του δυναμικού αυτού.

2.3 Η μέθοδος προσαρμογής φορτίων μέσω του ηλεκτροστατικού δυναμικού

Στην ενότητα αυτή θα παρουσιάσουμε τη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των μερικών ατομικών φορτίων μέσω του ηλεκτροστατικού δυναμικού [65-67]. Η διαδικασία προσαρμογής των φορτίων ξεκινάει με την εφαρμογή μεθόδων πρώτων αρχών έτσι ώστε να υπολογιστεί το ηλεκτροστατικό δυναμικό V_i σε ένα σύνολο σημείων γύρω από το μόριο. Στη συνέχεια εφαρμόζεται η μέθοδος των ελαχίστων

τετραγώνων για την προσαρμογή των φορτίων q_j σε κάθε άτομο j . Η υπολογιζόμενη τιμή του ηλεκτροστατικού δυναμικού \tilde{V}_i δίνεται από την σχέση:

$$\tilde{V}_i = \sum_j \frac{q_j}{r_{ij}} \quad (1)$$

Έτσι η ποσότητα x^2_{esp} που ελαχιστοποιείται στην διαδικασία ελαχίστων τετραγώνων ορίζεται ως:

$$x^2_{esp} = \sum_i (V_i - \tilde{V}_i)^2 \quad (2)$$

Στο ελάχιστο:

$$\partial(x^2_{esp})/\partial q_j = 0 \quad (3)$$

για όλες τις τιμές του j , όπου

$$\frac{\partial(x^2_{esp})}{\partial q_j} = -2 \sum \frac{V_i - \tilde{V}_i}{r_{ij}} = 0 \quad (4)$$

Έτσι σχηματίζεται ένα σύστημα εξισώσεων που μπορεί να λυθεί σε μορφή μήτρας με τον περιορισμό ότι το άθροισμα όλων των φορτίων q_j πρέπει να έχει ίδια τιμή με το συνολικό μοριακό φορτίο [68]. Στο x^2_{esp} προστίθεται μια συνάρτηση τιμωρίας (penalty function) οπότε η ποσότητα προς ελαχιστοποίηση γίνεται:

$$x^2 = x^2_{esp} + x^2_{rstr} \quad (5)$$

Το ελάχιστο τώρα ορίζεται από την σχέση:

$$\frac{\partial(x^2)}{\partial q_i} = \frac{\partial(x^2_{esp})}{\partial q_i} + \frac{\partial(x^2_{rstr})}{\partial q_i} = 0 \quad (6)$$

για όλες τις τιμές των j . Ως συνάρτηση τιμωρίας χρησιμοποιείται μια υπερβολική μορφή:

$$x^2_{rstr} = a \sum_j ((q_j^2 + b^2)^{1/2} - b) \quad (7)$$

όπου a είναι ένας παράγοντας ο οποίος ορίζει το ασυμπτωτικό όριο της έντασης των περιορισμών και ο b καθορίζει το άνοιγμα της υπερβολής γύρω από το ελαχιστό της. Ο δεύτερος όρος στη σχέση 6 γίνεται:

$$\frac{\partial(x_{rstr}^2)}{\partial q_j} = a q_j (q_j^2 + b^2)^{-1/2} \quad (8)$$

Η επίλυση γίνεται και πάλι σε μορφή μήτρας.

2.4 Ελαχιστοποίηση

Η αρχή της ελάχιστης συνολικής ενέργειας ενός συστήματος είναι μια θεμελιώδης έννοια που χρησιμοποιείται στη φυσική, στη χημεία, στη βιολογία και στην εφαρμοσμένη μηχανική. Οι αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης μπορούν να χωριστούν σε 2 κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιούν παραγώγους για την εύρεση του ελαχίστου και στη δεύτερη οι αλγόριθμοι που δεν χρησιμοποιούν παραγώγους. Ο ιδανικότερος αλγόριθμος είναι αυτός που απαιτεί όσο το δυνατό λιγότερο χρόνο για τον υπολογισμό του ελάχιστου, αλλά συνάμα δίνει και ακριβές αποτέλεσμα. Από τους υπάρχοντες αλγόριθμους δεν μπορούμε να χαρακτηρίσουμε κάποιον ως τον καλύτερο και η επιλογή που αλγορίθμου γίνεται ανάλογα με το προς εξέταση πρόβλημα που έχουμε. Οι μέθοδοι χωρίς την χρήση παραγώγων έχουν το πλεονέκτημα ότι είναι πιο απλές στην υλοποίηση τους διότι απαιτούνται μόνο οι τιμές της συνάρτησης και όχι οι παράγωγοι αυτής, έχουν όμως το μειονέκτημα ότι για μεγάλο αριθμό μεταβλητών η σύγκλιση τους είναι αρκετά αργή. Οι πιο γνωστές μέθοδοι χωρίς χρήση παραγώγων είναι η μέθοδος Simplex και η μέθοδος των εναλλασσόμενων μεταβλητών. Οι μέθοδοι οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διατριβή, είναι η μέθοδος της πιο απότομης καθόδου (Steepest Descent) και η μέθοδος των συζυγών κλίσεων (Conjugate Gradient).

2.4.1 Η μέθοδος της πιο απότομης καθόδου

Όπως αναφέρθηκε πρόκειται για μία μέθοδο που κάνει χρήση παραγώγων. Από όλες τις δυνατές διευθύνσεις s_k , αυτή που παρουσιάζει τη μέγιστη μείωση της συνάρτησης ονομάζεται μέθοδος της πιο απότομης καθόδου. Η διεύθυνση έχει αντίθετη φορά με το διάνυσμα των παραγώγων: $s_k = -g_k$.

Για την εύρεση του ελαχίστου ξεκινάμε από ένα αρχικό σημείο X_0 που λαμβάνεται αυθαίρετα και στη συνέχεια με σειρά επαναλαμβανόμενων βημάτων κάνουμε γραμμική αναζήτηση κατά μήκος της διεύθυνσης $s_k = -g_k$. Ο υπολογισμός του νέου σημείου γίνεται με βάση την αναδρομική σχέση:

$$X_{k+1} = X_k + a_k \cdot s_k$$

όπου a_k είναι το ελάχιστο που προκύπτει από την γραμμική αναζήτηση.

Η μέθοδος αυτή οδηγεί γρήγορα στο ελάχιστο όταν η αρχική διαμόρφωση είναι μακριά από αυτό. Όταν όμως βρεθούμε κοντά στην ελάχιστη τιμή παρουσιάζει πολύ αργή σύγκλιση. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο η μέθοδος αυτή συνήθως χρησιμοποιείται σε προκαταρκτικά στάδια ελαχιστοποίησης και αντικαθίσταται στη συνέχεια από άλλες πιο αποδοτικές μεθόδους.

2.4.2 Η μέθοδος συζυγών κλίσεων

Και αυτή η μέθοδος κάνει χρήση παραγώγων για την εύρεση του ελαχίστου. Αρχικά δίνεται ένα σημείο εκκίνησης και η μέθοδος παράγει διαδοχικές διευθύνσεις V_k ως εξής:

$$V_k = -g_k + \gamma_k V_{k-1}$$

Στη συνέχεια πραγματοποιεί γραμμική αναζήτηση στη διεύθυνση V_k από όπου προκύπτει το επόμενο σημείο. Η αρχική διεύθυνση V_0 τίθεται ίση με την διεύθυνση της πιο απότομης καθόδου $V_0 = -g$.

Η σταθερά γ_k είχε προταθεί από τους Fletcher και Reeves ως:

$$\gamma_k = \frac{g_k g_k}{g_{k-1} g_{k-1}}$$

Αργότερα προτάθηκε από τους Polak και Riebiere ένας άλλος αλγόριθμος όπου η σταθερά γ_k δίνεται από τη σχέση:

$$\gamma_k = \frac{(g_k - g_{k-1})g_k}{g_{k-1}g_{k-1}}$$

2.5 Μοριακή δυναμική

Η μοριακή δυναμική είναι μια μορφή προσομοίωσης που παρακολουθεί την χρονική εξέλιξη ενός συστήματος επιλύοντας κατάλληλες εξισώσεις κίνησης. Αυτό το είδος προσομοίωσης χρησιμοποιείται συχνά στη μελέτη πρωτεϊνών και βιομορίων, καθώς επίσης και στην επιστήμη των υλικών.

Η πρώτη προσομοίωση μοριακής δυναμικής ενός βιολογικού μακρομορίου δημοσιεύθηκε το 1977 [69]. Η προσομοίωση πραγματοποιήθηκε στον αναστολέα της θρυψίνης από πάγκρεας βοδιού (BPTI), σε δομή που είχε βρεθεί με περίθλαση ακτίνων X. Αν και η προσομοίωση διάρκεσε μόνο 9.2 picoseconds, τα αποτελέσματα παρείχαν ενδείξεις ότι οι πρωτεΐνες και άλλα βιολογικά συστήματα δεν είναι άκαμπτα, αλλά ότι είναι δυναμικά σύνολα ατόμων των οποίων οι κινήσεις διαδραματίζουν έναν λειτουργικό ρόλο [70]. Δύο έτη αργότερα, οι θερμικοί παράγοντες B, που είχαν υπολογιστεί από τις πειραματικές μετρήσεις της περίθλασης των ακτίνων X σε πρωτεϊνικούς κρυστάλλους, χρησιμοποιήθηκαν ως κριτήριο για τις εσωτερικές κινήσεις των πρωτεϊνών [71,72]. Κατά τη διάρκεια της επόμενης δεκαετίας ερευνήθηκε ένα ευρύ φάσμα δυναμικών φαινομένων χρησιμοποιώντας προσομοίωση ΜΔ [70], συμπεριλαμβανομένης της ανάλυσης της αποπόλωσης φθορισμού των καταλοίπων τρυπτοφάνης [73], του ρόλου της δυναμικής στις μετρούμενες με NMR παραμέτρους [74] και της ανελαστικής σκέδασης νετρονίων [75], της επίδρασης του διαλύτη και της θερμοκρασίας στην πρωτεϊνική δομή και τη δυναμική [76]. Άλλες μελέτες κατέδειξαν τη σημασία των εσωτερικών κινήσεων στη βιομοριακή

λειτουργία [70], την ευελιξία του tRNA [77], τις διακυμάνσεις που απαιτούνται για την είσοδο και την έξοδο των υποκαταστατών σε πρωτεΐνες που περιέχουν αίμη [78], και το ρόλο της εντροπίας στις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊνικά οξέα [79]. Όλα αυτά καθιστούν σαφή τη μεγάλη χρησιμότητα της μοριακής δυναμικής στο χώρο της βιολογίας και τον ρόλο που έπαιξε στην εξέλιξη της.

Κατά την κλασσική ατομιστική προσομοίωση [61,80,81] θεωρούμε ένα σύνολο σημειακών ατόμων που αλληλεπιδρούν με ένα γνωστό δυναμικό V . Τότε μπορούμε να υπολογίσουμε τη δύναμη που ασκείται σε κάθε άτομο:

$$F_i = -\frac{\partial V}{\partial R_i} \quad (1)$$

όπου R_i είναι η θέση των ατόμων

Όμως στην κλασσική περίπτωση:

$$F_i = m_i \cdot R_i'' \quad (2)$$

Ολοκλήρωση των δυο παραπάνω σχέσεων δίνει την ταχύτητα του κάθε ατόμου. Δεύτερη ολοκλήρωση δίνει τις νέες θέσεις των ατόμων. Η παραπάνω διαδικασία γίνεται επαναληπτικά.

Τα βήματα που ακολουθούμε σε μία προσομοίωση μοριακής δυναμικής είναι:

1. Καθορίζουμε τις παραμέτρους που προσδιορίζουν τις συνθήκες της προσομοίωσης.
2. Αναθέτουμε αρχικές θέσεις και ταχύτητες στα άτομα.
3. Υπολογίζουμε τις δυνάμεις που δρουν στα άτομα.
4. Ολοκληρώνουμε τις εξισώσεις κίνησης από όπου προκύπτουν οι νέες θέσεις των ατόμων.
5. Καταγράφουμε τις θέσεις και τις ταχύτητες των ατόμων.
6. Επαναλαμβάνουμε από το βήμα 3.

Τα βήματα 3-6 αποτελούν τον πυρήνα της προσομοίωσης και επαναλαμβάνονται μέχρι να έχουμε την εξέλιξη του συστήματος για το επιθυμητό χρονικό διάστημα.

2.5.1 Ο αλγόριθμος Verlet

Η αριθμητική επίλυση των εξισώσεων κίνησης γίνεται με τον αλγόριθμο Verlet ο οποίος προτάθηκε από το φυσικό Loup Verlet το 1967 [82]. Ο αλγόριθμος κάνει χρήση δύο αναπτυγμάτων Taylor τρίτης τάξεως για τον υπολογισμό των θέσεων. Το πρώτο αναφέρεται στην επόμενη χρονική στιγμή και το δεύτερο στην προηγούμενη.

$$r(t + \Delta t) = r(t) + r'(t)\Delta t + \frac{1}{2}r''(t)\Delta t^2 + \frac{1}{6}r'''(t)\Delta t^3 + O(\Delta t^4)$$

$$r(t - \Delta t) = r(t) - r'(t)\Delta t + \frac{1}{2}r''(t)\Delta t^2 - \frac{1}{6}r'''(t)\Delta t^3 + O(\Delta t^4)$$

Αθροίζοντας τις δυο ανωτέρω σχέσεις προκύπτει:

$$r(t + \Delta t) = 2r(t) - r(t - \Delta t) + r''(t)\Delta t^2 + O(\Delta t^4) = 2r(t) - r(t - \Delta t) + \frac{F}{m}\Delta t^2 + O(\Delta t^4)$$

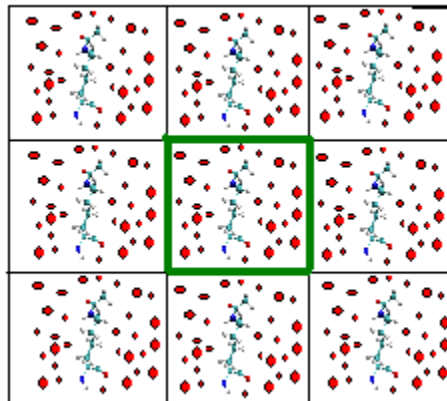
Ο αλγόριθμος αυτός προσφέρει μεγαλύτερη σταθερότητα από την απλούστερη μέθοδο Euler.

2.5.2 Περιοδικές συνθήκες

Ένα σύστημα μοριακής δυναμικής με περιοδικές συνθήκες [83,84] αποτελείται από ένα κεντρικό κουτί γεμάτο άτομα που περιβάλλεται από όλες τις πλευρές με πανομοιότυπα εικονικά κουτιά, αντίγραφα του κεντρικού, με χωροπληρωτικό τρόπο. Έτσι μια προσομοίωση εκτελείται με την χρήση μικρού αριθμού ατόμων με τέτοιο τρόπο, ώστε τα άτομα να υφίστανται δυνάμεις σαν να βρίσκονται σε ένα σύστημα άπειρου όγκου.

Το κουτί μπορεί να έχει σχήμα κυβικό, εξαγωνικού πρίσματος, ρομβικού δωδεκάεδρου, επιμηκυμένου δωδεκάεδρου ή οκταέδρου.

Στο σχήμα 2.3 βλέπουμε την απλούστερη περίπτωση εφαρμογής κυβικών περιοδικών συνθηκών. Οι συντεταγμένες των ατόμων που βρίσκονται στα περιβάλλοντα κουτιά σχετίζονται με αυτές του πρωταρχικού κουτιού με απλές μεταθέσεις. Οι δυνάμεις που ασκούνται στα άτομα του κυρίως κουτιού υπολογίζονται από τα άτομα του ίδιου κουτιού όπως και από τα άτομα των γειτονικών εικονικών κουτιών. Όταν ένα άτομο μετακινηθεί εκτός των ορίων μιας πλευράς του κουτιού, τοποθετείται αυτόματα στην αντίθετη πλευρά. Το ελάχιστο μέγεθος του κουτιού υπολογίζεται έτσι ώστε ένα άτομο στο πρωταρχικό κουτί να μην αλληλεπιδρά με την εικόνα του στα διπλανά κουτιά.



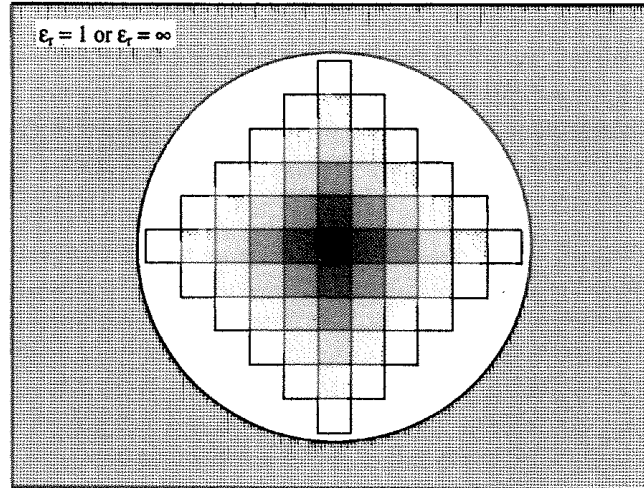
Σχ. 2.3 Αναπαράσταση της περίπτωσης κυβικών περιοδικών συνθηκών. Το προσομοιούμενο μόριο περιβάλλεται από μόρια νερού. Το κεντρικό κουτί απεικονίζεται με πράσινο χρώμα.

2.5.3 Η μέθοδος Particle Mesh Ewald

Το άθροισμα Ewald επινοήθηκε αρχικά από τον Ewald (1921) για να μελετήσει ενεργειακά ιοντικούς κρυστάλλους. Σε αυτή την μέθοδο κάθε σωματίδιο αλληλεπιδρά με όλα τα σωματίδια στο κουτί προσομοίωσης και με όλα τα περιοδικά είδωλα του [85].

Το παρακάτω σχήμα δείχνει πως κατασκευάζεται ένα κουτί προσομοίωσης; (σχήμα 2.3). Στα όρια θεωρούμε το κουτί να έχει σφαιρική κατανομή. Οι θέσεις των ατόμων κάθε

ειδώλου κουτιού βρίσκονται ως ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους του αρχικού κουτιού ($\pm iL, \pm jL, \pm kL$).



Σχ. 2.3 Κατασκευή συστήματος περιοδικού κουτιού με χρήση της μεθόδου Ewald.

Η συμβολή στη δυναμική ενέργεια από τις αλληλεπιδράσεις λόγω των ζευγών φορτίων του κεντρικού κουτιού μπορεί να γραφτεί:

$$V = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}$$

όπου r_i είναι η ελάχιστη απόσταση μεταξύ των φορτίων q_i και q_j . Παρατηρώντας στον τρισδιάστατο χώρο μπορούμε να διακρίνουμε ότι υπάρχουν 6 κουτιά γύρω από το κεντρικό κουτί σε μια απόσταση L με τις συντεταγμένες τους να είναι: $(0,0,L)$, $(0,0,-L)$, $(0,L,0)$, $(0,-L,0)$, $(L,0,0)$, $(-L,0,0)$. Στη γενική μορφή για ένα κουτί που τοποθετείται σε ένα σημείο $n = (nxL, nyL, nzL)$ η ενέργεια γίνεται:

$$V = \frac{1}{2} \sum_n \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 |r_{ij} + n|}$$

Όπου $|n|$ παίρνει τις τιμές $1, \sqrt{2}, \dots$

Έτσι διακρίνουμε μια συμβολή στην συνολική ενέργεια από τις αλληλεπιδράσεις στο κεντρικό κουτί και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του κεντρικού κουτιού και όλων των

ειδώλων αυτού. Επίσης υπάρχει η συνεισφορά από την αλληλεπίδραση μεταξύ των κουτιών και του περιβάλλοντος μέσου. Το πρόβλημα όμως που εμφανίζεται είναι ότι το ανωτέρω άθροισμα συγκλίνει εξαιρετικά αργά [86]. Ένα επιπλέον πρόβλημα των αλληλεπιδράσεων Coulomb είναι ότι μεταβάλλονται ταχύτατα σε μικρές αποστάσεις.

Το τέχνασμα για τον υπολογισμό του αθροίσματος Ewald είναι να το μετατρέψουμε σε δυο σειρές, κάθε μια από τις οποίες συγκλίνει πολύ γρηγορότερα.

Στην μέθοδο Ewald κάθε φορτίο θεωρείται ότι περιβάλλεται από μια κατανομή φορτίων ίσου μεγέθους αλλά αντίθετου πρόσημου. Συνήθως χρησιμοποιείται μια κατανομή Gauss της μορφής:

$$\rho_i(r) = \frac{q_i \alpha^3}{\pi^{3/2}} \exp(-\alpha^2 r^2)$$

Το άθροισμα πάνω στα σημειακά φορτία μετατρέπεται πλέον σε ένα άθροισμα μεταξύ των φορτίων συν την κατανομή ουδετεροποίησης [87]. Έτσι η ενέργεια γίνεται:

$$V = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \sum_{|n|=0}^{\infty} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 |r_{ij} + n|} \frac{\operatorname{erfc}(\alpha |r_{ij} + n|)}{|r_{ij} + n|}$$

όπου erfc είναι η συμπληρωματική συνάρτηση σφάλματος, ενώ ο τόνος στο άθροισμα δείχνει ότι η σειρά δεν περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση $i=j$ για το κεντρικό κουτί.

Το κρίσιμο σημείο είναι ότι το νέο άθροισμα, που περιλαμβάνει την erfc συγκλίνει πολύ γρήγορα και πέρα από κάποια απόσταση αποκοπής η τιμή του μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα. Μια δεύτερη κατανομή φορτίου προστίθεται τώρα στο σύστημα η οποία είναι ακριβώς αντίθετη με την προηγούμενη και η συνεισφορά της είναι:

$$V = \frac{1}{2} \sum_{k \neq 0} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{1}{\pi L^3} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0} \frac{4\pi^2}{k^2} \exp\left(-\frac{k^2}{4\alpha^2}\right) \cos(k \cdot r_{ij})$$

Η άθροιση γίνεται στον αντίστροφο χώρο και τα διανύσματα k δίνονται από $k=2\pi n/L$. Το αντίστροφο άθροισμα επίσης συγκλίνει πολύ πιο γρήγορα από το αρχικό άθροισμα των σημειακών φορτίων. Το άθροισμα των συναρτήσεων Gauss στον πραγματικό χώρο περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση κάθε συνάρτησης με τον εαυτό της που δίνεται από

$$V = -\frac{a}{\sqrt{\pi}} \sum_{k=1}^N \frac{q_k^2}{4\pi\epsilon_0} + \frac{2\pi}{3L^3} \left| \sum_{k=1}^N \frac{q_k}{4\pi\epsilon_0} r_k \right|^2$$

Επιπλέον απαιτείται ένας τέταρτος όρος, ανάλογα με το μέσο που περιβάλλει τα κουτιά προσομοίωσης. Εάν αυτό είναι το κενό τότε πρέπει να προστεθεί ο όρος:

$$V_{correction} = \frac{2\pi}{3L^3} \left| \sum_{i=1}^N \frac{q_i}{4\pi\epsilon_0} r_i \right|^2$$

Άρα η τελική έκφραση για την ενέργεια είναι:

$$V = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \left\{ \begin{array}{l} \sum_{|n|=0}^{\infty} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0} \frac{\operatorname{erfc}(a|r_{ij}+n|)}{|r_{ij}+n|} \\ + \sum_{k \neq 0} \frac{1}{\pi L^3} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0} \frac{4\pi^2}{k^2} \exp\left(-\frac{k^2}{4a^2}\right) \cos(k \cdot r_{ij}) \\ - \frac{a}{\sqrt{\pi}} \sum_{k=1}^N \frac{q_k^2}{4\pi\epsilon_0} + \frac{2\pi}{3L^3} \left| \sum_{k=1}^N \frac{q_k}{4\pi\epsilon_0} r_k \right|^2 \end{array} \right.$$

Το άθροισμα Ewald είναι υπολογιστικά ακριβό για να υλοποιηθεί και έχουν προταθεί αρκετές μέθοδοι για να επιταχύνουν τον υπολογισμό στον αντίστροφο χώρο. Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος είναι να τροποποιήσουμε το πρόβλημα έτσι ώστε να χρησιμοποιηθεί ο ταχύς μετασχηματισμός Fourier (Fast Fourier Transform-FFT).

Η μέθοδος FFT απαιτεί τα δεδομένα να μην είναι συνεχή αλλά να έχουν διακριτές τιμές. Έτσι τα σημειακά σημεία αντικαθίσταται με μια κατανομή φορτίων σε πλέγμα και κατανέμονται έτσι ώστε να αναπαράγουν το δυναμικό του αρχικού φορτίου. Μια δημοφιλής προσέγγιση είναι η μέθοδος Particle Mesh [88] η οποία χρησιμοποιεί τα 27 γειτονικά σημεία στις τρεις διαστάσεις. Από την κατανομή φορτίου στο πλέγμα είναι δυνατόν να υπολογιστεί το δυναμικό που οφείλεται στις κατανομές Gauss και το οποίο με παρεμβολή δίνει το επιθυμητό δυναμικό σε καθένα από τα σωματίδια.

2.5.4 Δυναμική Langevin

Όπως είναι γνωστό ένα μόριο σε ένα διάλυμα αλληλεπιδρά συνεχώς με γειτονικά μόρια του ίδιου συστήματος. Τα μόρια αυτά ασκούν δυνάμεις που σπρώχνουν το μόριο προς διάφορες κατευθύνσεις καθώς και δυνάμεις τριβής που μειώνουν την ταχύτητα της κίνησης του μορίου στο διάλυμα. Οι δυνάμεις αυτές αναπαρίστανται με την εξίσωση Langevin που περιγράφει την κίνηση ενός μορίου κάτω από την επιρροή τυχαίων συγκρούσεων με το περιβάλλον διαλύτη.

$$m_i a = F_i \{X_i(t)\} - \gamma_i v_i m_i + R_i(t)$$

ή διαφορετικά

$$M\ddot{X} = -\nabla U(X) - \gamma M\dot{X} + \sqrt{2\gamma k_B T} M R(t)$$

Στην εξίσωση Langevin η δύναμη που ασκείται στο μόριο χωρίζεται σε τρία μέρη: Την δια-ατομική δύναμη, $F_i \{X_i(t)\}$, εξαιτίας της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ατόμων του συστήματος, που είναι ίδια με τη δύναμη που χρησιμοποιείται στην εξίσωση κίνησης του Νεύτωνα. Τη δύναμη τριβής $R_i(t)$ που περιγράφει την έλξη στο μόριο εξαιτίας του διαλύτη. Το μέγεθος της έλξης σχετίζεται με τον συντελεστή τριβής γ_i . Τη στοχαστική δύναμη εξαιτίας θερμικών διακυμάνσεων του διαλύτη. Η δυναμική Langevin επιφέρει αύξηση του εύρους των δυναμικών κινήσεων των ατόμων, προκαλεί δηλαδή περισσότερη κινητικότητα του συστήματος σε μικρότερο χρόνο προσομοίωσης. Χρησιμοποιείται για να διατηρείται η θερμοκρασία σταθερή με χρήση επιπρόσθετων δυνάμεων τριβής και τυχαίων δυνάμεων που επάγονται στο σύστημα.

2.6 Μοντέλα επιδιалύτωσης

Το μεγαλύτερο ποσοστό του ανθρώπινου οργανισμού αποτελείται από νερό, για παράδειγμα το κύτταρο έχει ποσοστό 90% σε νερό. Σε ένα βιολογικό σύστημα είναι δυνατόν να προσομοιώσουμε τον υδατικό διαλύτη με δύο τρόπους. Είτε με άμεση

επιδιαλύτωση (explicit solvation) είτε με έμμεση προσομοίωση του διαλύτη (implicit solvation).

2.6.1 Μοντέλο άμεσης επιδιαλύτωσης

Τα μοντέλα ρητής παρουσίας νερού χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία κάθε μόριο νερού διατηρείται σε μια άκαμπτη γεωμετρία και η αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων περιγράφεται από το εκάστοτε χρησιμοποιούμενο πεδίο δυνάμεων. Στη δεύτερη κατηγορία επιτρέπονται εσωτερικές αλλαγές στη δομή του διαλύτη, που περιγράφεται με το μοντέλο του αρμονικού ταλαντωτή για την μεταβολή των δεσμών και της γωνίας H-O-H στο μόριο.

Το πρώτο μοντέλο νερού αναπτύχθηκε από τους Stillinger και Rahman [89] και αποτελείται από 5 περιοχές (ST2). Στο πρότυπο αυτό οι αλληλεπιδράσεις Van Der Waals υπολογίζονται με την χρήση εξισώσεων Lennard-Jones με ακριβώς ένα σημείο αλληλεπίδρασης ανά μόριο που κεντροθετείται στο άτομο οξυγόνου του μορίου. Τα φορτία τοποθετούνται στα άτομα υδρογόνου σε απόσταση 0.8 Å από το άτομο του οξυγόνου. Εκτενείς υπολογισμοί με χρήση του προαναφερθέντος προτύπου έδειξαν ότι είναι σε θέση να αναπαράγει ικανοποιητικά ένα ευρύ φάσμα από δομικές, ενεργειακές καθώς και δυναμικές ιδιότητες που περιγράφουν το νερό. Παρόλα αυτά το συγκεκριμένο μοντέλο παρουσιάζει το μειονέκτημα, ότι αυξάνει πάρα πολύ τον υπολογιστικό χρόνο που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί η προσομοίωση. Για τον λόγο αυτό ο Jorgensen στις αρχές της δεκαετίας του '80 ανέπτυξε τα μοντέλα Transferable Intermolecular Potential Surfaces (TIPS) [90,91]. Το πρώτο μοντέλο τύπου TIPS περιλάμβανε μόνο 3 περιοχές αλληλεπίδρασης και αποτελείτο από ένα άκαμπτο μονομερές μόριο με τα φορτία να τοποθετούνται σε κάθε ένα από τα τρία άτομα που αποτελούν το νερό. Οι τιμές των φορτίων είναι $-q$ για το οξυγόνο και $+0.5q$ για κάθε άτομο υδρογόνου, που οριοθετούνται στα ατομικά κέντρα τους, ενώ μια περιοχή αλληλεπίδρασης Lennard-Jones κεντροθετείται στο άτομο του οξυγόνου. Οι πρώτες προσομοιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή αυτού του μοντέλου ήταν τύπου Monte Carlo και κατάφεραν να αναπαράγουν ικανοποιητικά την πυκνότητα και τη θερμότητα της εξάτμισης για το νερό.

Ο Berendsen και η ερευνητική του ομάδα ανέπτυξαν τα πρότυπα SPC. Πρόκειται για μοντέλα που παρήχθησαν από τα TIPS με σκοπό να βελτιώσουν την δομή πέρα από την πρώτη κορυφή στη σφαιρική κατανομή πυκνότητας οξυγόνου-οξυγόνου (g_{oo}) [92]. Το 1983 αναπτύχθηκε το μοντέλο TIP3P, ένα επαναπαραμετροποιημένο μοντέλο TIPS, που αναπτύχθηκε με κύριο σκοπό να μπορέσουν να αναπαραχθούν ακριβώς οι τιμές της ενέργειας και της πυκνότητας μέσα από πρότυπα τριών περιοχών [93]. Εντούτοις, το TIP3P απέτυχε να αναπαράγει τη δεύτερη κορυφή στη σφαιρική κατανομή πυκνότητας οξυγόνου-οξυγόνου. Το 1987 ο Berendsen και η ερευνητική του ομάδα ανέπτυξαν το πρότυπο SPC/E, μία ενημερωμένη έκδοση του SPC, που διαφοροποιείται από την προγενέστερη της στο ότι ενσωματώνει μια διόρθωση στη πολωσιμότητα [94]. Ακόμη το εν λόγω πρότυπο δίνει καλύτερα αποτελέσματα για τον υπολογισμό του συντελεστή διάχυσης και της σφαιρικής κατανομής πυκνότητας.

Επιπλέον έχουν αναπτυχθεί και πρότυπα τεσσάρων περιοχών από τους Bernal και Fowler (BF) [95]. Στα πρότυπα 4 περιοχών BF το αρνητικό φορτίο βρίσκεται σε μία απόσταση 0.15 \AA από το άτομο του οξυγόνου προς το άτομο του υδρογόνου, ενώ η περιοχή αλληλεπίδρασης Lennard-Jones εξακολουθεί να βρίσκεται κεντροθετημένη στο άτομο του οξυγόνου. Με την βοήθεια των αποτελεσμάτων από τα πρότυπα BF ο Jorgesen και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν αργότερα τα μοντέλα TIP2S και TIP4P [93]. Η σύγκριση με το πείραμα έδειξε ότι το μοντέλο TIP4P μπορεί να αναπαράγει πολλές από τις ιδιότητες για το νερό, όπως είναι η πυκνότητα (+0.2%), η εσωτερική ενέργεια (+1.5%), η ενθαλπία της εξάτμισης (+1.4%), και η θερμοχωρητικότητα (+7.3%). Το πρότυπο TIP4P παρήγαγε επίσης την κατάλληλη μορφή για την δεύτερη κορυφή της g_{oo} .

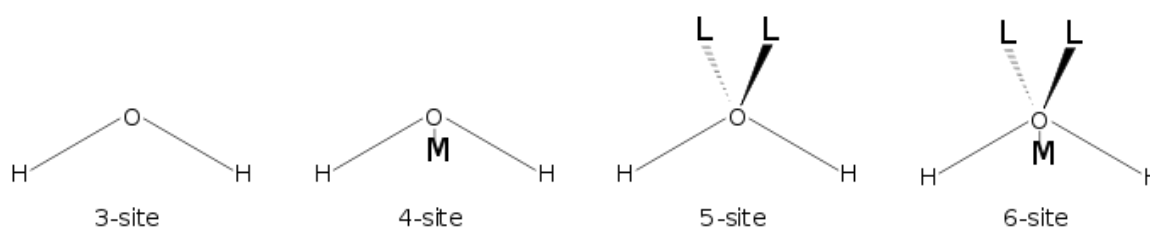
Περαιτέρω επέκταση αποτελεί το πρότυπο TIP5P [96]. Οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals μεταξύ 2 μορίων νερού υπολογίζονται με χρήση ενός ενιαίου σημείου αλληλεπίδρασης που κεντροθετείται στο άτομο οξυγόνου του κάθε μορίου. Τα αποτελέσματα από δοκιμές για το μοντέλο TIP5P ήταν άκρως εντυπωσιακά, αφού κατάφερε να αναπαράγει την εξάρτηση της πυκνότητας από την θερμοκρασία με ένα μέσο όρο λάθους μικρότερο του 1% σε τιμές από -37.5 έως $62.5 \text{ }^\circ\text{C}$. Επίσης η διηλεκτρική σταθερά είχε τιμή πλησίον του 80 και είχε την σωστή σχέση με την θερμοκρασία.

Ακόμη από τους Nada και Van Der Eerden αναπτύχθηκε ένα πρότυπο 6 περιοχών για το νερό [97]. Σε αυτό το πρότυπο ένα θετικό σημειακό φορτίο τοποθετείται σε κάθε άτομο

υδρογόνου και ένα αρνητικό σε κάθε περιοχή απομονωμένου ζευγαριού. Ένα αρνητικό φορτίο τοποθετείται επίσης στην περιοχή όπου βρίσκεται η μέση της γωνίας HOH. Σημαντική διαφοροποίηση του συγκεκριμένου προτύπου με τα πρότυπα TIP4P και TIP5P είναι ότι η αλληλεπίδραση Van Der Waals δεν ενεργεί μόνο στα άτομα οξυγόνου, αλλά και σε αυτά του υδρογόνου. Αυτό το πρότυπο ύδατος έξι περιοχών αναπτύχθηκε για να προσομοιώσει τον πάγο και το υγρό νερό κοντά στην σημείο τήξης. Δομικές και θερμοδυναμικές ιδιότητες του πάγου και του νερού κοντά στο σημείο τήξης κατάφεραν να αναπαραχθούν ικανοποιητικά.

Είναι εμφανές ότι η χρήση ενός άκαμπτου προτύπου, όπως είναι όλα τα προαναφερθέντα πρότυπα, είναι μια προσέγγιση που πιθανόν να μην μπορεί να καθορίσει καλά κάποιες ιδιότητες. Παρόλα αυτά η χρήση των παραπάνω προτύπων είναι επιστημονικά αποδεκτή σε προσομοίωση ενός βιομορίου, διότι οι ιδιότητες που δεν μπορούν να αναπαράγουν ακριβώς δεν διαφοροποιούν το αποτέλεσμα της προσομοίωσης.

Στο παρακάτω σχήμα 2.4 φαίνεται μια σχηματική αναπαράσταση των στερεοχημικών τύπων των προτύπων νερού που έχουν αναπτυχθεί έως σήμερα.



Σχ. 2.4 Γενική μορφή των προτύπων που αποτελούνται από 3 έως 6 περιοχών. Οι ακριβείς γεωμετρικές παράμετροι (η απόσταση OH και η γωνία HOH) ποικίλλουν ανάλογα με το πρότυπο.

2.6.2 Έμμεση προσομοίωση διαλύτη

Η έμμεση ή συναρτησιακή προσομοίωση διαλύτη (implicit solvation) είναι μια μέθοδος, όπου ο διαλύτης χρησιμοποιείται σαν συνεχές μέσο, που αντικαθιστά τα μεμονωμένα «ρητά» μόρια νερού. Με αυτό τον τρόπο διαλυτοποίηση ενός συστήματος αποφεύγεται η χρήση διακριτών μορίων. Η μέθοδος εφαρμόζεται συχνά στην εκτίμηση της ελεύθερης ενέργειας μεταξύ των αλληλεπιδράσεων διαλυμένης ουσίας και διαλύτη στις δομικές και χημικές διεργασίες, όπως είναι το «δίπλωμα» ή οι διαμορφωτικές μεταβολές των πρωτεϊνών, του DNA, του RNA και πολυσακχαριτών.

Το εσωτερικό των πρωτεϊνών και των βιολογικών μεμβρανών μπορεί να θεωρηθεί ως μέσο με συγκεκριμένη διαλυτότητα και διηλεκτρικές ιδιότητες. Το πρόβλημα της συναρτησιακής προσομοίωσης διαλύτη ανάγεται στην αριθμητική επίλυση των εξισώσεων Poisson-Boltzmann με το σύστημα να διαχωρίζεται στο διαλυμένο βιομόριο, που έχει χαμηλή διηλεκτρική σταθερά, και τον διαλύτη, με υψηλή διηλεκτρική σταθερά.

Η εξίσωση Poisson Boltzmann [98,99], παρέχει το θεωρητικό πλαίσιο για τον υπολογισμό του ηλεκτροστατικού όρου της ελεύθερης ενέργειας επιδιαλύτωσης. Για τον πλήρη υπολογισμό της ελεύθερης ενέργειας επιδιαλύτωσης είναι απαραίτητη η προσαρμογή των μη πολικών όρων σχηματισμού της κοιλότητας και των αλληλεπιδράσεων Van Der Waals με το διαλύτη. Μια τέτοια προσθήκη όμως είναι αναπόφευκτο να αυξάνει και το υπολογιστικό κόστος με αποτέλεσμα να καθιστά δύσκολη την χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου σε πολλές εφαρμογές, μια από τις οποίες είναι και η μοριακή δυναμική.

Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι έμμεσης επιδιαλύτωσης. Ο πρώτος είναι το μοντέλο που βασίζεται στην ύπαρξη προσιτών περιοχών επιφάνειας και καλείται SASA (Solvent-Accessible Surface Area). Το πρότυπο αυτό ιστορικά είναι το πρώτο που αναπτύχθηκε, αλλά βέβαια έως σήμερα έχουν αναπτυχθεί διάφορες τροποποιήσεις του εν λόγω προτύπου. Στο πρότυπο SASA εφαρμόζεται μέθοδος που είναι βασισμένη στις πειραματικές γραμμικές σχέσεις μεταξύ της ελεύθερης ενέργειας Gibbs και το εμβαδόν της επιφάνειας του μορίου της διαλυμένης ουσίας [100]. Αυτή η μέθοδος λειτουργεί άμεσα με την ελεύθερη ενέργεια του διαλύτη, εν αντιθέσει με ηλεκτροστατικές μεθόδους που κάνουν χρήση μόνο ενθαλπικών συστατικών της ελεύθερης ενέργειας. Οι απαραίτητες παράμετροι

που χρησιμοποιούνται για διαφορετικούς τύπους ατόμων λαμβάνονται από προσαρμογή με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων στις υπολογισμένες και πειραματικές τιμές της ελεύθερης ενέργειας μεταφοράς για μια σειρά από οργανικές ενώσεις. Οι πειραματικές ενέργειες καθορίζονται από συντελεστές κατανομής αυτών των ενώσεων μεταξύ των διαφορετικών διαλυμάτων ή των μέσων που χρησιμοποιούν τις κανονικές συγκεντρώσεις μορίων των ουσιών που διαλύονται [101].

Ο δεύτερος τύπος που αναπτύχθηκε από τον Still και τους συνεργάτες του είναι το πρότυπο GB/SA (Generalized Born/Surface Area) [102-105]. Στο μοντέλο αυτό η επιφάνεια ASA ισούται με το άθροισμα της επιφάνειας Van Der Waals και της ακτίνας του διαλύτη και η επιφανειακή τάση ισούται με μια σταθερή θετική τιμή. Η θετική αυτή τιμή μπορεί να θεωρηθεί σαν μια ενέργεια δημιουργίας κοιλότητας. Η μέθοδος GBSA είναι μεταξύ των συνηθέστερων μεθόδων συναρτησιακής προσομοίωσης διαλυτών. Όταν η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται στη μοριακή μηχανική καλείται MM/GBSA. Το μοντέλο αυτό κρίνεται ικανοποιητικό όταν χρησιμοποιείται σε μεθόδους μοριακής δυναμικής για ολιγοπεπίδια με σαφώς καθορισμένη τριτοταγή δομή.

2.7 Ανάλυση αποτελεσμάτων

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής χρησιμοποιήθηκαν κατά κύριο λόγο οι ποσότητες που περιγράφονται παρακάτω.

2.7.1 Μέση τετραγωνική μετατόπιση

Η μέση τετραγωνική μετατόπιση (Root Mean Square Distance - RMSD) είναι το μέτρο της απόκλισης μεταξύ δομών της κύριας αλυσίδας των πρωτεϊνών. Ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος τρόπος να συγκριθούν οι δομές των βιομορίων είναι εξεταστεί η μετατόπιση που μπορεί να προκαλείται στις θέσεις των ατόμων (συνήθως προς εξέταση είναι μόνο τα άτομα της κύριας αλυσίδας) από μια δομή σε μια άλλη κατά την χρονική

εξέλιξη του συστήματος. Η σταθερότητα στην διακύμανση αυτής της μεταβολής παρέχει ένδειξη ότι το σύστημα βρίσκεται σε δυναμική ισορροπία. Ο τύπος που παρέχει το RMSD είναι:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^{i=N} \delta_i^2}$$

Όπου δ_i είναι η απόσταση μεταξύ των N ζευγαριών ισοδύναμων ατόμων.

2.7.2 Συνάρτηση κατανομής πιθανότητας

Η συνάρτηση κατανομής πιθανότητας περιγράφει την πιθανότητα για μια τυχαία μεταβλητή να λάβει τιμές εντός ενός συγκεκριμένου διαστήματος. Η πιθανότητα αυτή εκφράζεται από το ολοκλήρωμα της συνάρτησης κατανομής πιθανότητας εντός της περιοχής προς εξέταση. Ως εκ τούτου είναι προφανές ότι η συνάρτηση κατανομής πιθανότητας δεν μπορεί να πάρει αρνητικές τιμές και το ολοκλήρωμα της σε όλο το χώρο θα είναι ίσο με την μονάδα. Βασικός λόγος που γίνεται χρήση αυτής της ποσότητας είναι όταν αντικειμενικός σκοπός μας είναι να δείξουμε την έκταση μιας μεταβολής, δηλαδή το ποσοστό του χρόνου που εμφανίζεται και όχι τις συγκεκριμένες χρονικές στιγμές που συμβαίνει.

2.7.3 Συνάρτηση σφαιρικής κατανομής

Η συνάρτηση σφαιρικής κατανομής δίνεται από τον τύπο:

$$g(r) = \frac{2V}{N^2} \left\langle \sum_{i < j} \delta(r - r_{ij}) \right\rangle$$

όπου V είναι ο όγκος του συστήματος και N είναι το πλήθος των ατόμων. Από τον παραπάνω ορισμό προκύπτει ότι η ποσότητα $\rho g(r) dr$ (όπου ρ η πυκνότητα του συστήματος)

είναι ανάλογη της πιθανότητας να βρεθεί ένα άτομο σε απόσταση από r έως $r+dr$ από ένα άλλο άτομο. Στις τρεις διαστάσεις η ποσότητα $4\pi r^2 \Delta r$ αντιπροσωπεύει το μέσο αριθμό ατόμων που βρίσκονται σε ένα κέλυφος ακτίνας r και πάχους Δr .

2.7.4 Μέση τετραγωνική διακύμανση

Η κινητικότητα των ατόμων της πρωτεΐνης προκύπτει από την μέση τετραγωνική διακύμανση (Root Mean Square Fluctuation-RMSF) που ορίζεται ως:

$$RMSF = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^N (\vec{r}(t_j) - \langle \vec{r} \rangle)^2}{N_a}}$$

Όπου N είναι ο αριθμός στιγμιότυπων στη τροχιά, $\vec{r}(t_j)$ οι συντεταγμένες του ατόμου στο στιγμιότυπο j και $\langle \vec{r} \rangle$ η μέση θέση του ατόμου. Οι τιμές αυτές μπορούν να συγκριθούν άμεσα με πειραματικές τιμές των θερμικών παραγόντων β που προκύπτουν από μεθόδους κρυσταλλογραφίας ακτίνων X, χρησιμοποιώντας την σχέση:

$$B = \frac{8\pi^2}{3} (RMSF)^2$$

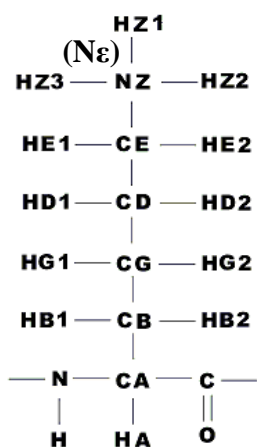
3. Παραμετροποίηση τροποποιημένων αμινοξέων

3.1 Υπολογισμός μερικών φορτίων των τροποποιημένων αμινοξέων

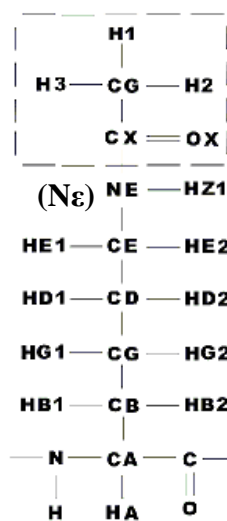
Όπως έχει αναπτυχθεί διεξοδικά στα προηγούμενα κεφάλαια οι τροποποιήσεις των αμινοξέων παίζουν πάρα πολύ σημαντικό ρόλο στην υπολογιστική βιολογία. Η βασική παράμετρος που χρήζει υπολογισμού προκειμένου να χρησιμοποιηθούν τα τροποποιημένα αμινοξέα σε μελέτες μοριακής δυναμικής είναι η τιμή των μερικών ατομικών φορτίων (partial charges) κάθε ατόμου στο τροποποιημένο αμινοξύ.

Στο παρόν κεφάλαιο θα αναπτυχθούν οι παράμετροι για τις περιπτώσεις μεθυλίωσης της λυσίνης: μόνο-, δι- και τρι- μεθυλιωμένη λυσίνη (M.Λ, 2M.Λ, 3M.Λ αντίστοιχα) καθώς και για την ακετυλίωση αυτής (Ακ.Λ) (Σχ. 3.1). Επίσης υπολογίζονται παράμετροι για τις περιπτώσεις της μόνο- και δι- μεθυλιωμένης αργινίνης. Η διμεθυλιωμένη αργινίνη μπορεί να είναι είτε συμμετρική είτε ασύμμετρη (M.Αρ, 2M.Σ.Αρ, 2M.Ασ.Αρ) (Σχ. 3.2).

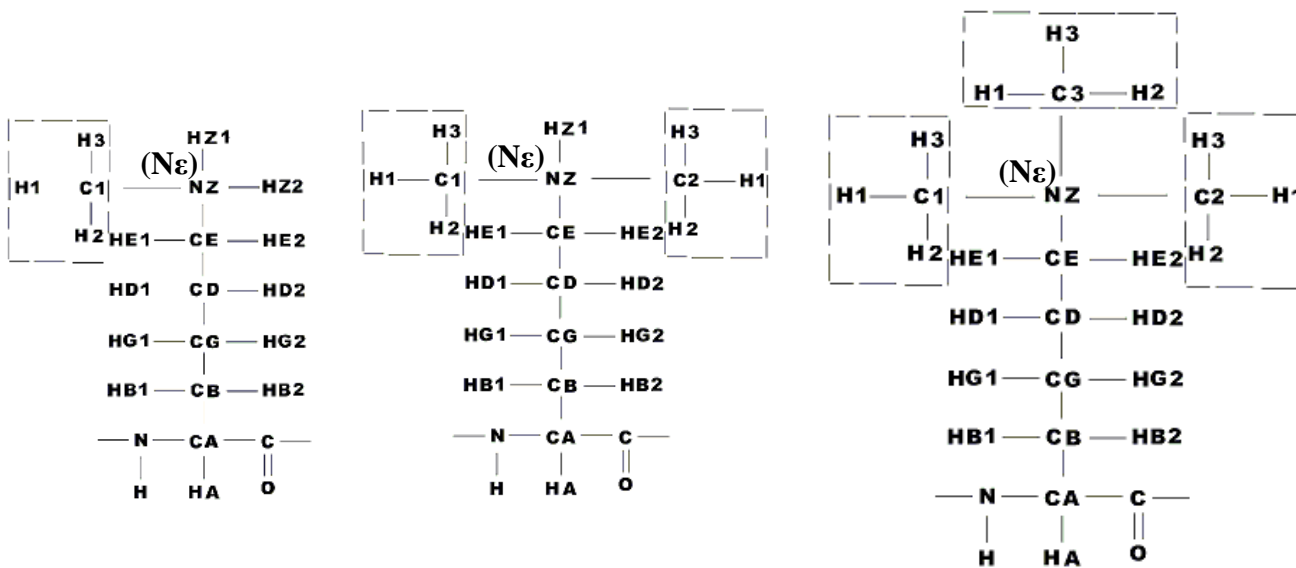
Για τον υπολογισμό αυτών των παραμέτρων, ανάλογα βέβαια πάντα με το δυναμικό στο οποίο θα γίνει η προσαρμογή τους, ακολουθείται μια συγκεκριμένη πορεία. Στην περίπτωση μας η παραμετροποίηση έγινε για το δυναμικό τύπου Amber parm94/parm99 [106,107]. Ακολουθήθηκε η τυπική διαδικασία προσαρμογής φορτίων [108]. Αρχικά έγινε κατασκευή ενός μοντέλου το οποίο αποτελείται από το τροποποιημένο αμινοξύ τερματισμένο στις 2 άκρες του με ακετύλο- και N- μέθυλο ομάδες (Σχ.3.3). Σε κάθε περίπτωση εξετάστηκαν 2 δυνατές διαμορφώσεις. Πιο συγκεκριμένα στην μία περίπτωση έχουμε την α -ελικοειδή διαμόρφωση του αμινοξέος με τιμές διεδρων γωνιών ϕ , ψ σε -60 και -40 μοίρες αντίστοιχα, ενώ η δεύτερη διαμόρφωση είναι η β -εκτεταμένη με τιμές διεδρων ϕ , ψ γωνιών στις -120 και 140 μοίρες αντίστοιχα. Για τις τιμές των χ γωνιών γίνονται χρήση των αποτελεσμάτων όπως αυτά προβλέπονται από τους υπολογισμούς των φορτίων των ατροποποίητων αμινοξέων [109]. Στην περίπτωση της μεθυλιωμένης λυσίνης δεν υπάρχει καμία σαφής διαμορφωσιακή προτίμηση για τον προσανατολισμό του μεθυλίου, γι' αυτό το λόγο θα εξεταστούν οι 3 δυνατοί προσανατολισμοί αυτού και για τις 2 διαμορφώσεις του μοντέλου. Ως εκ τούτου οδηγούμαστε συνολικά σε 6 διαφορετικές δομές. Το ίδιο ακριβώς συμβαίνει και στην περίπτωση της διμεθυλιωμένης λυσίνης, όποτε οδηγούμαστε πάλι σε 6 διαφορετικές δομές.



α) Λυσίνη



β) Ακετυλιωμένη Λυσίνη

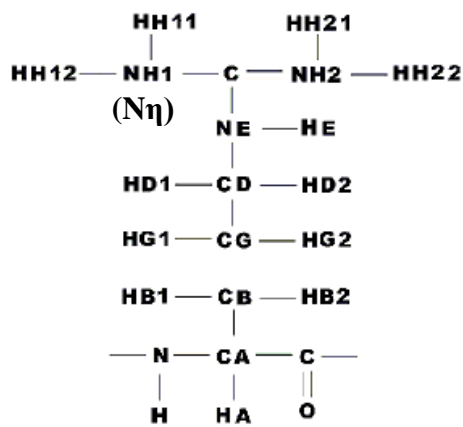


γ) Μεθυλιωμένη Λυσίνη

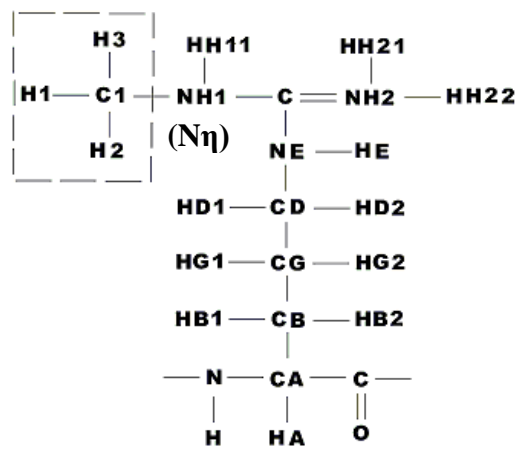
δ) Διμεθυλιωμένη Λυσίνη

ε) Τριμεθυλιωμένη Λυσίνη

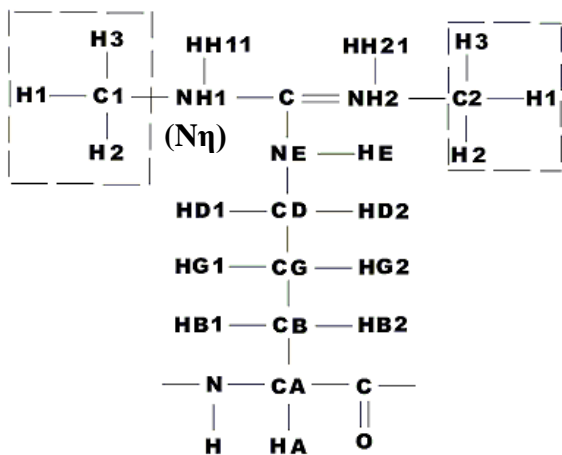
Σχ. 3.1 Ονοματολογία για της τροποποιήσεις της λυσίνης



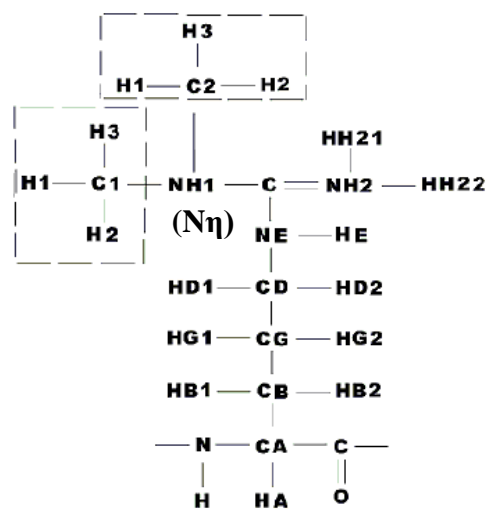
α) Αργινίνη



β) Μεθυλιωμένη Αργινίνη

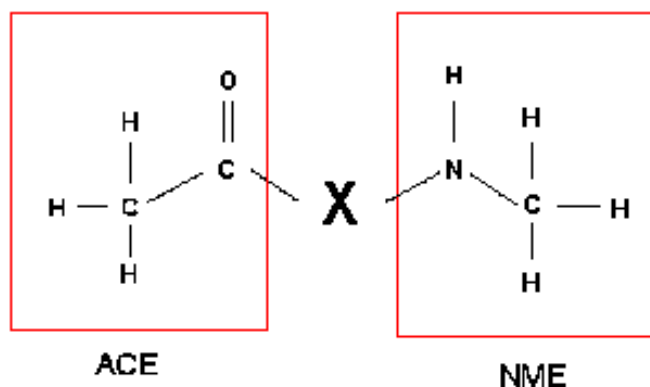


γ) Συμμετρικά Διμεθυλιωμένη Αργινίνη



δ) Ασύμμετρα Διμεθυλιωμένη Αργινίνη

Σχ. 3.2 Ονοματολογία για της τροποποιήσεις της Αργινίνης.



Σχ.3.3 Αναπαράσταση του συστήματος, όπου X είναι το τροποποιημένο αμινοξύ που έχουμε σε κάθε περίπτωση.

Στην συνέχεια σε όλα τα μοντέλα πραγματοποιήθηκε γεωμετρική βελτιστοποίηση με υπολογισμούς πρώτων αρχών σε επίπεδο θεωρίας HF/6-31G*. Ακολούθησε υπολογισμός του ηλεκτροστατικού δυναμικού για κάθε μία από τις ελαχιστοποιημένες δομές. Μπορεί να παρατηρήσει κανείς ότι η προσθήκη της μεθυλ- και ακετυλ- ομάδας αλλάζει μόλις οριακά τις τιμές των χ γωνιών των αντίστοιχων καθαρών αμινοξέων (πίνακας 3.1). Τέλος εφαρμόζεται η μέθοδος προσαρμογής RESP δυο σταδίων [65,107] από όπου λαμβάνονται τα τελικά μερικά ατομικά φορτία. Για τους υπολογισμούς πρώτων αρχών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Gaussian98 [110], ενώ για τους υπολογισμούς των μερικών ατομικών φορτίων το πακέτο Ambergtools [111,112]

Στον πίνακα 3.2 που ακολουθεί δίνονται οι τιμές όλων των ατομικών φορτίων και για τις 7 περιπτώσεις των τροποποιημένων αμινοξέων, όπως αυτές προέκυψαν από την προαναφερθείσα υπολογιστική διαδικασία. Τα αρχεία αυτά των παραμέτρων είναι διαθέσιμα και σε μορφή leap για άμεση χρησιμοποίησή τους με το πακέτο λογισμικού AMBER.

		Λυσ	Μ.Λ	2Μ.Λ	3Μ.Λ	Ακ.Λ	Αρ.	Μ.Αρ	2Μ.Σ.Αρ	2Μ.Ασ.Αρ
Φ	α	-60	-60	-60	-60	-60	-60	-60	-60	-60
	β	-155	-155	-155	-155	-155	214	214	214	214
Ψ	α	-40	-40	-40	-40	-40	-40	-40	-40	-40
	β	153	153	153	153	153	145	145	145	145
χ^1	α	-67	-69	-70	-70	-68	-62	-63	-63	-63
	β	-172	-171	-172	-172	-169	179	175	175	174
χ^2	α	-171	-171	-172	-172	-177	-174	-178	-178	-179
	β	180	176	176	173	176	160	163	163	162
χ^3	α	177	176	176	177	180	-179	180	180	180
	β	-162	-177	-179	167	-178	-69	-71	-72	-72
χ^4	α	-177	178	176	-176	-180	-77	-82	-81	-76
	β	73	63	62	70	65	177	179	179	-175
χ^5	α		69			-87				
	β		65			-92				

Πίνακας 3.1 Οι τιμές των διεδρων γωνιών που προέκυψαν μετά την βελτιστοποίηση. Δείχνονται συγκριτικά και οι ήδη υπολογισμένες για τις ατροποποίητες δομές.

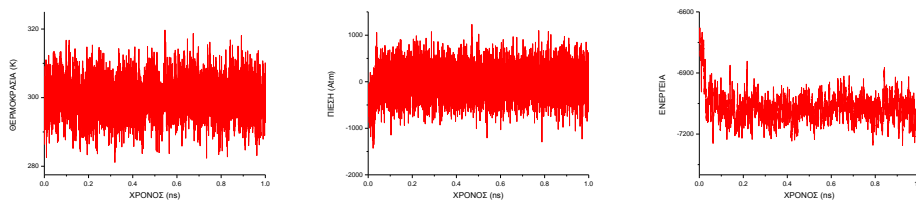
	M.Α	2M.Α	3M.Α	Ακ.Α	M.Αρ.	2M.Σ.Αρ	2M.Ασ.Αρ
C	0.7341	0.7341	0.7341		0.7341	0.7341	0.7341
N	-0.3479	-0.3479	-0.3479	-0.4157	-0.3479	-0.3479	-0.3479
H	0.2747	0.2747	0.2747	0.2719	0.2747	0.2747	0.2747
O	-0.5894	-0.5894	-0.5894		-0.5894	-0.5894	-0.5894
CA	-0.0818	-0.2314	-0.1515	0.0064	-0.1363	-0.1473	-0.1474
HA	0.1695	0.1892	0.1762	0.1309	0.1433	0.1471	0.1438
CB	-0.5617	-0.1039	-0.4131	-0.3362	-0.2749	-0.2654	-0.2141
HB1	0.1285	0.0432	0.1197	0.0957	0.0737	0.0695	0.0573
HB2	0.1285	0.0432	0.1197	0.0957	0.0737	0.0695	0.0573
CG	0.3845	0.1184	0.2432	0.1886	0.1708	0.2322	0.0821
HG1	-0.0732	-0.0416	-0.0537	-0.0281	-0.0020	-0.0122	0.0223
HG2	-0.0732	-0.0416	-0.0537	-0.0281	-0.0020	-0.0122	0.0223
CD	0.0365	0.1215	-0.1150	0.0171	-0.0115	-0.1423	0.0465
HD1	0.0626	0.0329	0.0385	0.0356	0.0834	0.1277	0.0749
HD2	0.0626	0.0329	0.0385	0.0356	0.0834	0.1277	0.0749
NZ/NE	-0.2403	-0.0552	0.0694	-0.3214	-0.3170	-0.4598	-0.4345
HE/HZ	0.3364	0.3267		0.2699	0.3054	0.3571	0.3245
CE/CZ	-0.4150	-0.3540	-0.3734	-0.1751	0.5135	0.5308	0.5780
HE1	0.2236	0.2035	0.2013	0.0991			
HE2	0.2236	0.2035	0.2013	0.0991			
NH1					-0.4121	-0.0876	-0.5931
NH2					-0.8047	-0.7703	-0.5931
C1/CX	-0.2129	-0.3787	-0.3463	0.2433	-0.2849	-0.2296	0.3563
C2/CGX		-0.3787	-0.3463	0.3263		-0.2296	0.3563
C3			-0.3463				
HH12					0.3947		0.3639
HH21					0.4232	0.4090	
HH22					0.4232	0.4090	0.3639
HC1	0.1646	0.1949	0.1877	-0.0539	0.1617	0.1342	-0.0023
HC2	0.1646	0.1949	0.1877	-0.0539	0.1617	0.1342	-0.0023
HC3	0.1646	0.1949	0.1877	-0.0539	0.1617	0.1342	-0.0023
HC4		0.1949	0.1877			0.1342	-0.0023
HC5		0.1959	0.1877			0.1342	-0.0023
HC6		0.1949	0.1877			0.1342	-0.0023
HC7			0.1877				
HC8			0.1877				
HC9			0.1877				
OX				-0.4788			

Πίνακας 3.2 Οι τιμές των ατομικών φορτίων και για τα 7 τροποποιημένα αμινοξέα.

3.2 Διαμορφωσιακός χώρος των τροποποιημένων αμινοξέων

Αφού υπολογίστηκαν τα μερικά ατομικά φορτία, για καθένα από τα τροποποιημένα αμινοξέα, πραγματοποιήθηκε προσομοίωση μοριακής δυναμικής για να ελεγχθεί ο διαμορφωσιακός τους χώρος. Πιο συγκεκριμένα κατασκευάστηκαν 7 διαφορετικά συστήματα αποτελούμενα το καθένα από το τροποποιημένο αμινοξύ τερματισμένο με ακέτυλο και N-μέθυλο ομάδες. Στη συνέχεια προστέθηκαν ιόντα Cl^- για να γίνει το συνολικό φορτίο του συστήματος ουδέτερο. Τέλος προστέθηκαν στο σύστημα μόρια νερού από το μοντέλο τύπου TIP3P σε απόσταση 10 \AA από τα άκρα του μορίου.

Στην συνέχεια σε καθένα από τα 7 διαφορετικά συστήματα πραγματοποιήθηκε αρχικά ελαχιστοποίηση της ενέργειας σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο διατηρήθηκαν σταθερές οι συντεταγμένες των ατόμων της διαλυμένης ουσίας ενώ η ελαχιστοποίηση της ενέργειας έγινε μόνο ως προς τις θέσεις των μορίων νερού. Κατά το δεύτερο στάδιο αίρονται οι περιορισμοί και πραγματοποιείται εκ νέου ελαχιστοποίηση όλου του συστήματος. Μετά την ολοκλήρωση των 2 πρώτων σταδίων ξεκινάει η προσομοίωση μοριακής δυναμικής στο ελαχιστοποιημένο πλέον σύστημα η οποία γίνεται και αυτή σε δυο στάδια. Αρχικά πραγματοποιείται προσομοίωση στο μικροκανονικό σύστημα, για χρονικό διάστημα 0.2 ns και σε θερμοκρασία προσομοίωσης 300 K . Στη συνέχεια στο τελικό στάδιο, όπου γίνεται και η συλλογή των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται προσομοίωση στο ισόθερμο-ισοβαρές σύστημα για χρονικό διάστημα 1 ns σε θερμοκρασία 300 K και σε πίεση 1 atm . Κατά την μοριακή δυναμική έγινε χρήση του θερμοστάτη και βαροστάτη Langevin [113]. Το βήμα της προσομοίωσης ορίστηκε στα 2 fs και η καταγραφή των αποτελεσμάτων γινόταν κάθε 1 ps . Στο σχ.3.4 φαίνονται ενδεικτικά οι τιμές πίεσης, θερμοκρασίας και της ολικής ενέργειας του συστήματος για την περίπτωση της μονομεθυλιωμένης λυσίνης. Τα αντίστοιχα διαγράμματα για όλες τις περιπτώσεις δίνονται στο παράρτημα Α.



α) Θερμοκρασία

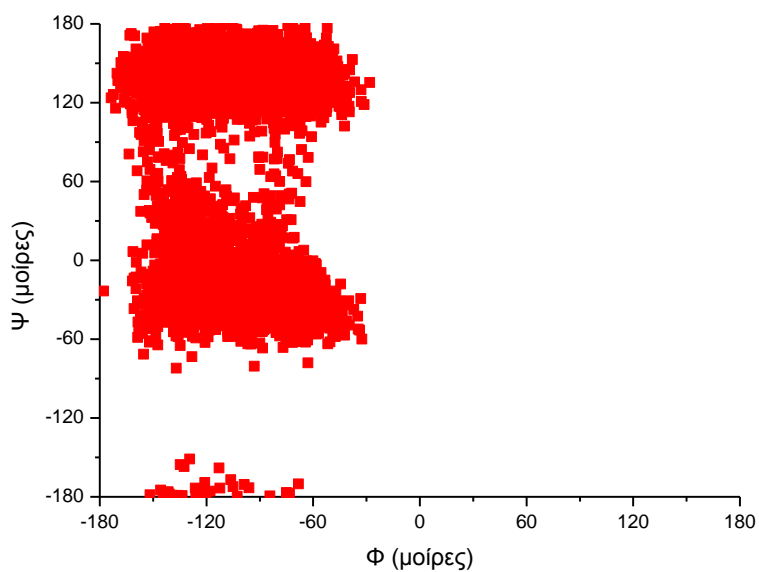
β) Πίεση

γ) Ενέργεια

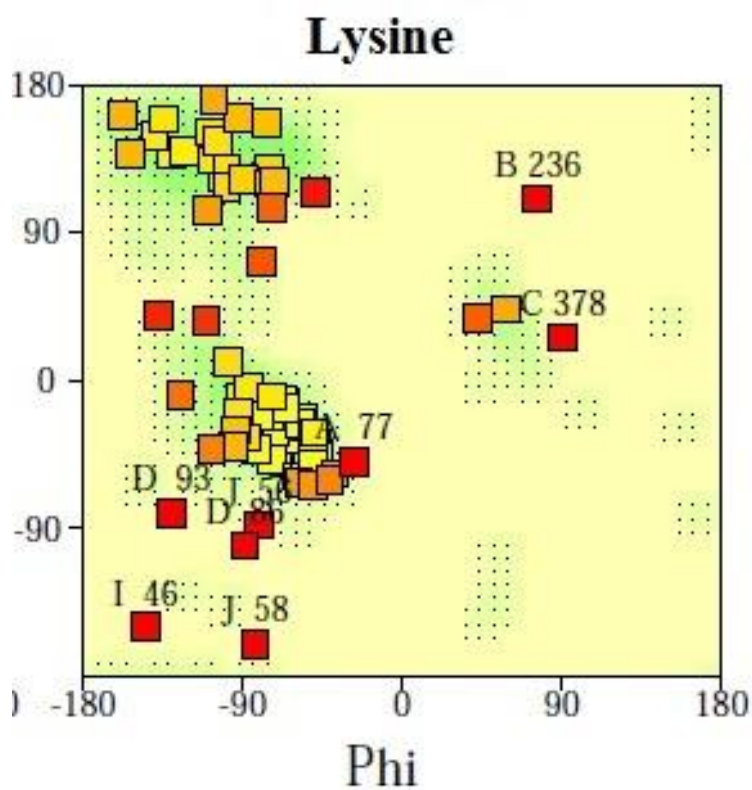
Σχ. 3.4 Αποτελέσματα κατά την μοριακή δυναμική του συστήματος για την περίπτωση της μεθυλιωμένης λυσίνης.

3.2.2 Διαγράμματα Ramachandran

Η δομή ενός αμινοξέος καθορίζεται κατά κύριο λόγο από τις τιμές των διεδρων γωνιών Φ και Ψ οι οποίες απεικονίζονται με χρήση των διαγραμμάτων Ramachandran [114]. Η μεγάλη σπουδαιότητα αυτών των διαγραμμάτων έγκειται στο γεγονός ότι από την γνώση του ζεύγους διεδρων Φ - Ψ σε κάθε χρονική στιγμή είμαστε σε θέση να καθορίσουμε την συμπεριφορά της κύριας αλυσίδας του εν λόγω αμινοξέος πράγμα πολύ σημαντικό και για την συμπεριφορά εν γένει ολόκληρου του πεπτιδίου. Στα σχήματα που ακολουθούν δίνονται τα διαγράμματα Ramachandran για όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν. Κάθε σημείο αντιστοιχεί και σε μια χρονική στιγμή. Παρατηρώντας τα σχήματα 3.5 έως 3.10 διακρίνουμε σε όλες τις περιπτώσεις (μοναδική εξαίρεση μόνο η διμεθυλιωμένη λυσίνη) να εμφανίζονται 2 περιοχές μέσα στις οποίες συναντάμε τις διέδρες Φ - Ψ . Συγκεκριμένα η πρώτη περιοχή δίνει τιμές στη γωνία Φ από -50 έως -150 μοίρες και στην Ψ από 120 έως 180 μοίρες, ενώ η δεύτερη δίνει πάλι τιμές στην Φ από -50 έως -150 μοίρες και στην Ψ από -60 έως 60 μοίρες. Ακόμη παρατηρούμε ότι η τροποποίηση δεν επιφέρει σημαντική μεταβολή στην συμπεριφορά της κύριας αλυσίδας τόσο στην περίπτωση της λυσίνης (σχ. 3.5 έως σχ. 3.7) όσο και της αργινίνης (σχ. 3.8 έως 3.10).

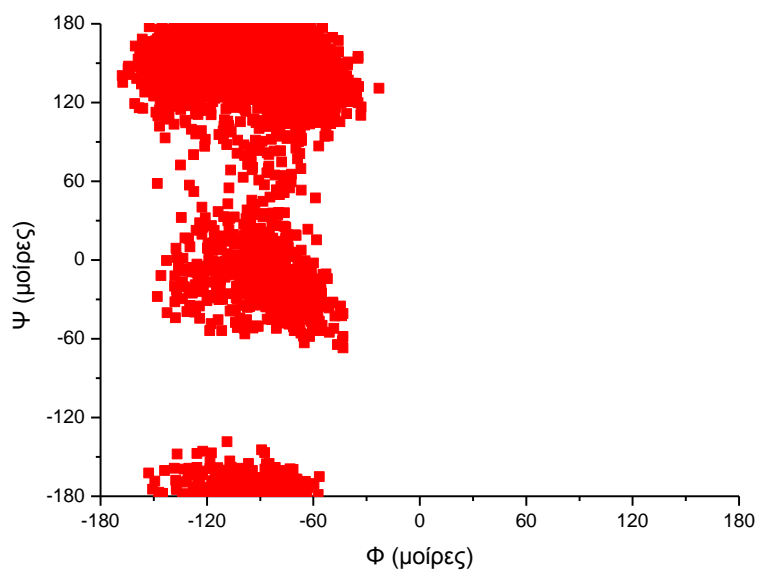


α) Λυσίνη (από μοριακή δυναμική)

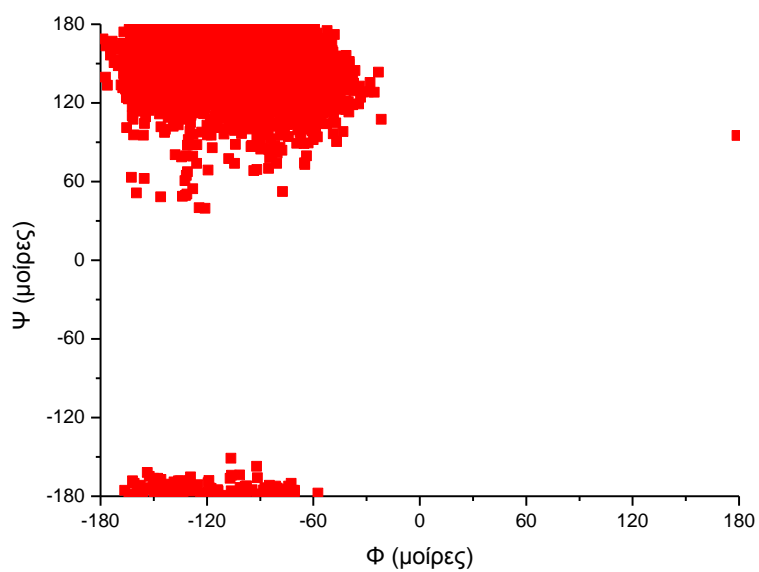


β) Λυσίνη

Σχ. 3.5 Διαγράμματα Ramachandran για την Λυσίνη α) με χρήση ΜΔ β) από βιβλιογραφία (πηγή: www.birec.org).

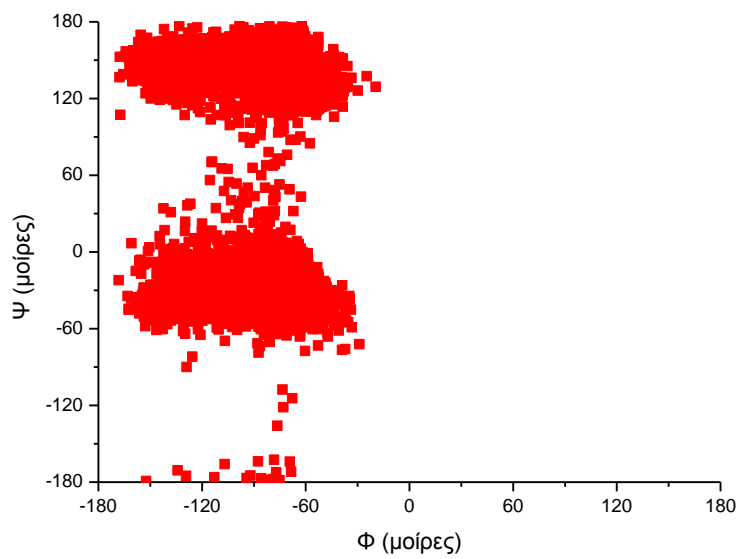


α) Μεθυλιωμένη λυσίνη

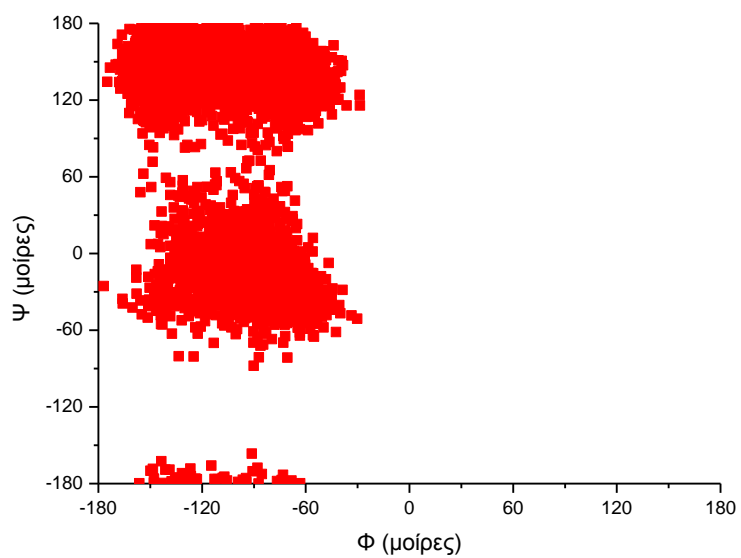


β) Διμεθυλιωμένη λυσίνη

Σχ.3.6 Διαγράμματα Ramachandran για την α) Μεθυλιωμένη Λυσίνη και β) Διμεθυλιωμένη Λυσίνη.

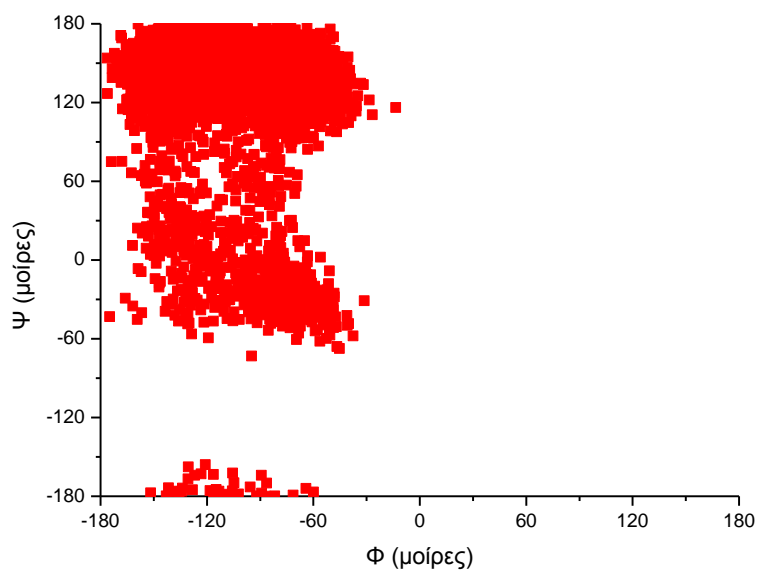


α) Τριμεθυλιωμένη λυσίνη

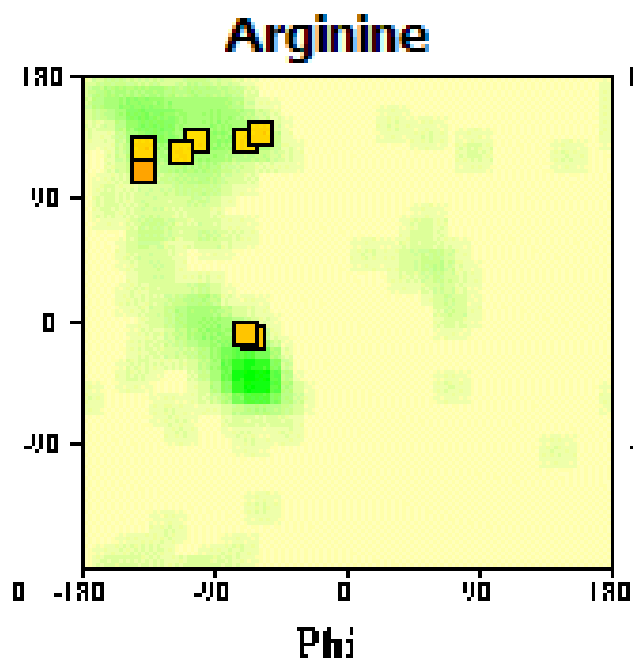


β) Ακετυλιωμένη λυσίνη

Σχ.3.7 Διαγράμματα Ramachandran για την α) Τριμεθυλιωμένη Λυσίνη και β) Ακετυλιωμένη Λυσίνη.

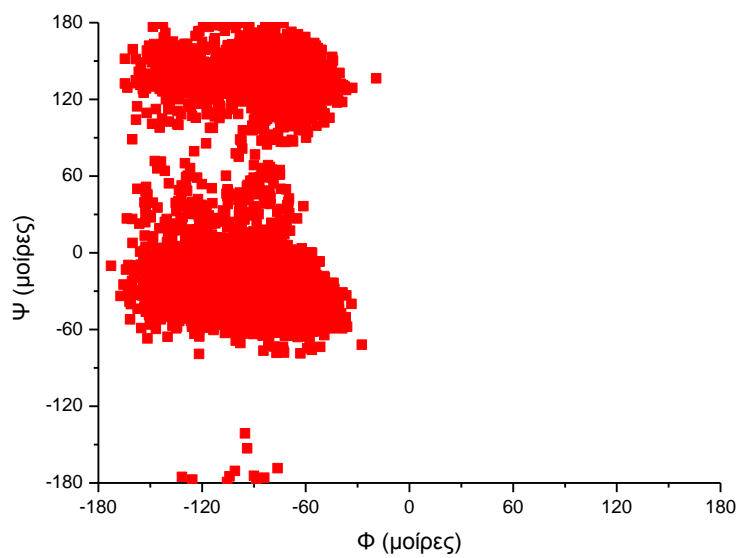


α) Αργινίνη (από μοριακή δυναμική)

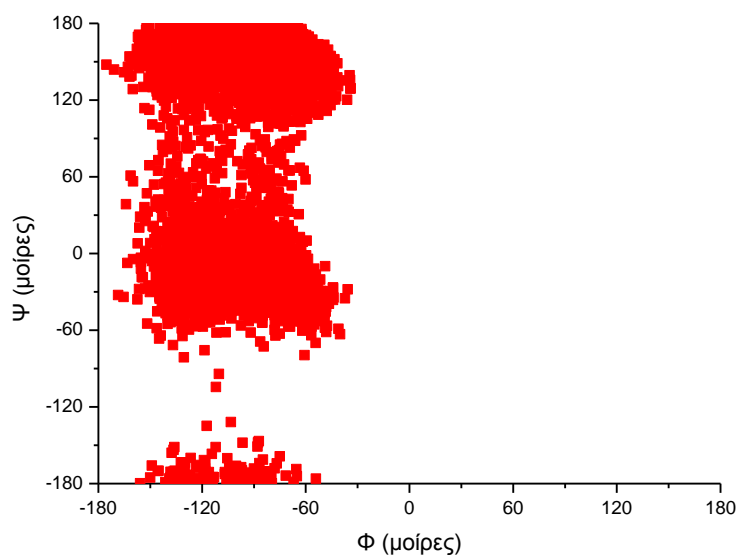


β) Αργινίνη

Σχ. 3.8 Διαγράμματα Ramachandran για την Αργινίνη α) με χρήση ΜΔ β) από βιβλιογραφία (πηγή: www.ebi.ac.uk).

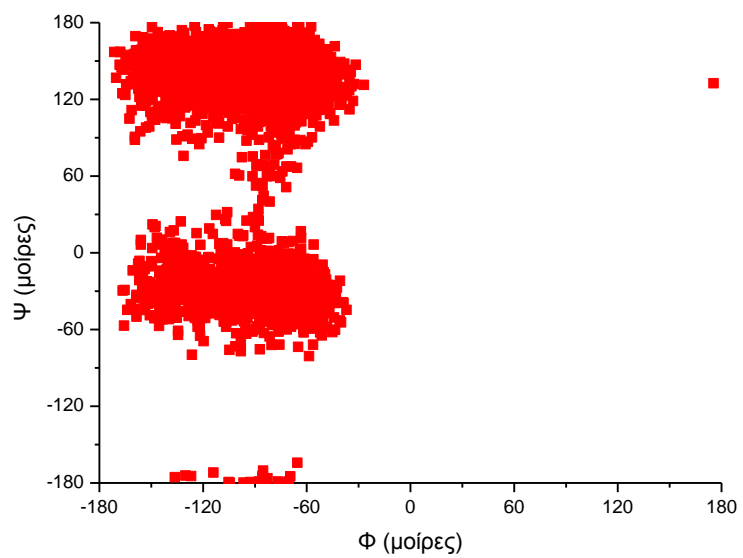


α) Μεθυλιωμένη Αργινίνη



β) Συμμετρικά διμεθυλιωμένη αργινίνη

Σχ.3.9 Διαγράμματα Ramachandran για την α) Μεθυλιωμένη Αργινίνη και β) Συμμετρικά Διμεθυλιωμένη Αργινίνη.



Σχ.3.10 Διαγράμματα Ramachandran για την Ασύμμετρα Διμεθυλιωμένη Αργινίνη.

4. Το σύστημα HP1-H3

4.1 Εισαγωγή

Όπως είναι γνωστό η υπόθεση του ιστονικού κώδικα αποτέλεσε μια από τις «υποθέσεις εργασίας» για την αποκρυπτογράφηση μερικών από τους επιγενετικούς μηχανισμούς [115]. Ο πιο γνωστός μηχανισμός που προτάθηκε ήταν της ύπαρξης δυαδικών μεταβάσεων στις «ιστονικές ουρές», που θα μπορούσαν να προκληθούν από την ανταγωνιστική συμπεριφορά που παρουσιάζουν η φωσφορυλίωση της σερίνης ή της θρεονίνης με γειτονικά μεθυλιωμένα κατάλοιπα λυσίνης [19]. Αυτή η διαπίστωση ήταν κάτι που αμφισβητήθηκε έντονα μιας και οι πρώτες μελέτες που δημοσιεύθηκαν αμφισβητούσαν την δυνατότητα συνύπαρξης μεθυλιωμένης λυσίνης 9 και φωσφορυλιωμένης σερίνης 10 [116]. Το αρχικό αυτό εύρημα στη συνέχεια και με την βοήθεια *in vivo* δεδομένων διαψεύστηκε και επιβεβαιώθηκε ότι είναι εφικτή η συνύπαρξη της μεθυλίωσης με την φωσφορυλίωση [117]. Μελέτες που πραγματοποίησαν 2 ερευνητικές ομάδες με αντικείμενο την μεθυλίωση της λυσίνης 9 και την ταυτόχρονη φωσφορυλίωση της σερίνης 10 [23,118] όταν το κύτταρο βρίσκεται στη φάση M του κυτταρικού κύκλου έδειξαν ότι η απομάκρυνση της HP1 από την μεθυλιωμένη ιστόνη H3 οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην φωσφορυλίωση της σερίνης 10. Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύει ακόμα περισσότερο την ύπαρξη ενός δυαδικού διακόπτη ελέγχου για το σύστημα.

Παρόλα αυτά η πλήρης κατανόηση αυτού του σύνθετου ρυθμιστικού δικτύου δεν έχει ακόμα επιτευχθεί. Ένα απλό παράδειγμα που δηλώνει του λόγου το αληθές είναι ότι μέχρι προσφάτως η μεθυλίωση της ιστόνης θεωρείτο μία μη αντιστρεπτή διεργασία, όμως πρόσφατες μελέτες έδειξαν το αντίθετο [119].

Ο Y-K. Jiang και η ομάδα του δημοσίευσαν 2 εργασίες στις οποίες μελέτησαν την διαμορφωτική συμπεριφορά της πρωτεΐνης και του ολιγοπεπτιδίου με προσομοίωση μοριακής δυναμικής για χρονικό διάστημα 10 ns στο σύστημα της HP1 με την H3 [120,121]. Συγκεκριμένα έγιναν μελέτες σε μονο- και τριμεθυλιωμένα κατάλοιπα της λυσίνης 9 της ιστόνης H3 όταν βρίσκεται μαζί με την HP1. Οι αρχικές τους δομές βρέθηκαν από την κρυσταλλική βάση δεδομένων (δομές 1Q3L και 1KNE αντίστοιχα). Οι ερευνητές αυτοί κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η φωσφορυλίωση του ολιγοπεπτιδίου αυξάνει την ευελιξία και αποδυναμώνει την σύνδεση της HP1 στην χρωματίνη.

Ο Η. Liu, και ο Y. Duan μελέτησαν τις διαμορφωτικές αλλαγές που συμβαίνουν από την μεθυλίωση και την ακετυλίωση της λυσίνης 4 και της λυσίνης 9 σε ένα σύστημα 18-καταλοίπων της ιστόνης H3 [122]. Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας έδειξαν ότι διμεθυλίωση είτε της λυσίνης 4 είτε της λυσίνης 9 σταθεροποιεί τις κατειλημμένες καταστάσεις, ενώ ταυτόχρονη ακετυλίωση αυτών των αμινοξέων αλλάζει την ελικοειδή διαμόρφωση και την σταθερότητα των περισσοτέρων κατειλημμένων καταστάσεων.

Τέλος ο M. R. Machado και η ομάδα του [123] πραγματοποίησαν μελέτες μοριακής δυναμικής για το σύστημα της HP1 με την H3. Για την μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε ως βάση η δομή 1GUW που έχει προσδιοριστεί με NMR [124]. Η δομή αυτή περιλαμβάνει 18 κατάλοιπα της H3 και 73 υπολείμματα της HP1. Κύριο γνώρισμα αυτής της δομής είναι ότι η λυσίνη 9 είναι τριμεθυλιωμένη. Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε μετάλλαξη του γλουταμικού 16 και του γλουταμικού 18 σε αλανίνη και προλίνη αντίστοιχα. Ακόμη πραγματοποιήθηκαν και υπολογισμοί σε συστήματα που περιελάμβαναν και φωσφορυλίωση της σερίνης 10. Όλες οι προσομοιώσεις πραγματοποιήθηκαν με το πεδίο δυνάμεων Amber και για χρονικό διάστημα 60 ns. Από τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας το σημαντικότερο συμπέρασμα που εξήχθη είναι ότι το γλουταμικό 16 και το γλουταμικό 18 αποτελούν επιπλέον σημεία σύνδεσης της H3 με την HP1 και ότι η τροποποίηση της σερίνης έχει ως αποτέλεσμα την μερική αποσταθεροποίηση της σύνδεσης της λυσίνης στον αρωματικό κλωβό χωρίς όμως να είναι ικανή από μόνη της να αποκολλήσει την H3 από την HP1.

4.2 Τροποποιήσεις που μελετήθηκαν στο σύστημα HP1-H3

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το σύστημα HP1-H3 για 10 διαφορετικές περιπτώσεις τροποποιήσεων της αργινίνης 8, της λυσίνης 9 και της σερίνης 10 της ιστόνης H3.

Αναλυτικά οι περιπτώσεις που μελετήθηκαν ήταν:

A) Χωρίς διμεθυλίωση της αργινίνης 8:

- 1) Μονομεθυλίωση της λυσίνης 9 (RKmeS).

- 2) Μονομεθυλίωση της λυσίνης 9 και ταυτόχρονη φωσφορυλίωση της σερίνης 10 (RKmeSphos).
- 3) Διμεθυλίωση της λυσίνης 9 (RKme₂S).
- 4) Διμεθυλίωση της λυσίνης 9 και ταυτόχρονη φωσφορυλίωση της σερίνης 10. (RKme₂Sphos).
- 5) Τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 (RKme₃S).
- 6) Τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 και ταυτόχρονη φωσφορυλίωση της σερίνης (RKme₃Sphos).

B) Με μετάλλαξη της αργινίνης 8 σε γλυκίνη:

- 1) Μονομεθυλίωση της λυσίνης 9 και ταυτόχρονη φωσφορυλίωση της σερίνης 10 (GKmeSphos).
- 2) Τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 και ταυτόχρονη φωσφορυλίωση της σερίνης (GKme₃Sphos).

Γ) Με διμεθυλίωση της αργινίνης 8:

- 1) Μονομεθυλίωση της λυσίνης 9 και ταυτόχρονη φωσφορυλίωση της σερίνης 10 (Rme₂KmeSphos).
- 2) Τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 και ταυτόχρονη φωσφορυλίωση της σερίνης 10 (Rme₂Kme₃Sphos).

4.2.1 Κατασκευή του μοντέλου

Η κατασκευή του μοντέλου που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση έγινε χρησιμοποιώντας ως βάση κρυσταλλογραφικά δεδομένα προερχόμενα από την πρωτεϊνική βάση δεδομένων (PDB). Για την περίπτωση που το σύστημα περιελάμβανε μονομεθυλίωση της λυσίνης 9 χρησιμοποιήθηκε η δομή 1Q3L [125] [σχ. 4.1], για διμεθυλίωση η δομή

1KNA [35] και για την τριμεθυλίωση η δομή 1KNE [35]. Οι επιπλέον τροποποιήσεις, όπου χρειαζόταν (φωσφορυλίωση της σερίνης και διμεθυλίωση της αργινίνης) προστέθηκαν με αλλαγή του αρχείου συντεταγμένων της κάθε κρυσταλλικής δομής. Με ίδιο τρόπο πραγματοποιήθηκε και η μετάλλαξη της αργινίνης σε γλυκίνη. Κάθε δομή περιλαμβάνει 52 κατάλοιπα της HP1 (από το 23-74) και 6 κατάλοιπα της H3 (από το 5-10). Σε κάθε σύστημα αρχικά προστέθηκαν ιόντα Cl^- ή Na^+ για να γίνει ουδέτερο το συνολικό φορτίο του συστήματος. Στη συνέχεια προστέθηκε άλας χλωριούχου νατρίου σε συγκέντρωση 0.2 M. Για την περίπτωση των μεθυλιωμένων αμινοξέων χρησιμοποιήθηκαν οι παράμετροι φορτίων του προηγούμενου κεφαλαίου. Στην περίπτωση της φωσφορυλιωμένης σερίνης έγινε χρήση των παραμέτρων που εξήχθησαν από τους Craft και Legge [126]. Τέλος όλο το σύστημα εμπλουτίστηκε με ρητή παρουσία μορίων νερού με το μοντέλο TIP3P, μέχρις αποστάσεως 10 Å περιμετρικά από τα άκρα του μορίου σε ένα κυβικό κουτί. Ο αριθμός των μορίων νερού που προστέθηκε είναι περίπου 4000. Όλες οι προσομοιώσεις πραγματοποιήθηκαν για χρονικό διάστημα 1 μs εκτός από την Rme₂KmeSphos που έγινε για διάστημα 500 ns.

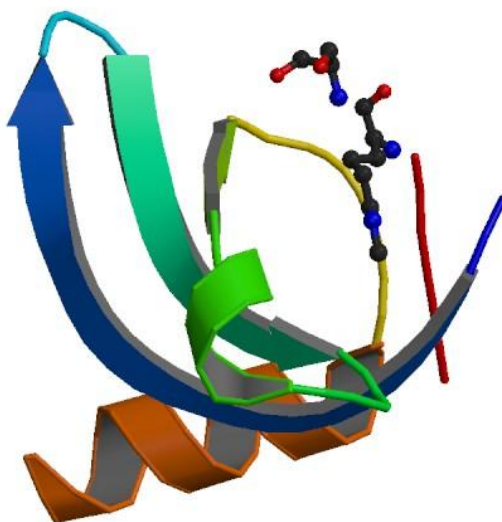
4.2.2 Γενικά χαρακτηριστικά των κρυσταλλογραφικών δομών

Η δομή 1Q3L αποτελείται από συνολικό αριθμό 58 καταλοίπων, 52 από αυτά ανήκουν στην HP1 και 6 ανήκουν στην H3. Η κρυστάλλωση του συγκεκριμένου συστήματος έγινε με μέθοδο X-Ray. Στον πίνακα 4.1 δείχνουμε τα κατάλοιπα από τα οποία απαρτίζεται η HP1 και η H3 του εν λόγω συστήματος.

	Αμινοξέα
HP1	-E-Y-A-V-E-K-I-I-D-R-R-V-R-K-G-M-V-E-Y-Y-L-K-W-K-G-Y-P-E-T- E-N-T-W-E-P-E-N-N-L-D-C-Q-D-L-I-Q-Q-Y-E-A-S-
H3	-Q-T-A-R-K _{me} -S-

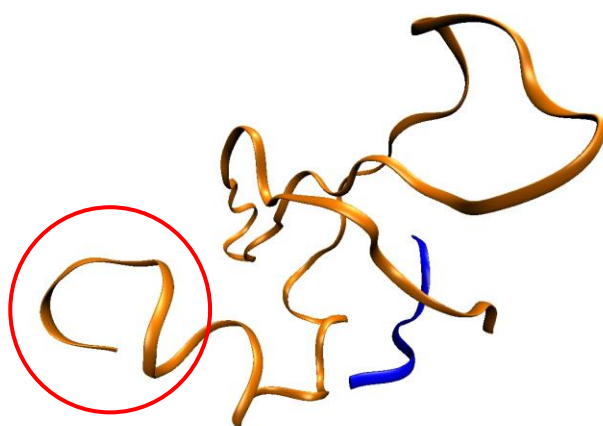
Πίνακας 4.1 Η σειρά των αμινοξέων που έχει η κρυσταλλογραφική δομή 1Q3L.

Στο σχήμα 4.1 φαίνεται η κρυσταλλογραφική δομή 1Q3L. Πιο συγκεκριμένα μπορούμε να διακρίνουμε ότι η HP1 της 1Q3L περιέχει ένα β- πτυχωτό φύλλο στα πρώτα περίπου 20 αμινοξέα της σειράς, μια 310 έλικα για πολύ μικρό μέρος της και ένα τμήμα της (περίπου 15 αμινοξέα) έχει α-ελικοειδή διαμόρφωση, ενώ παρατηρώντας την H3 βλέπουμε ότι βρίσκεται σε εκτεταμένη διαμόρφωση.



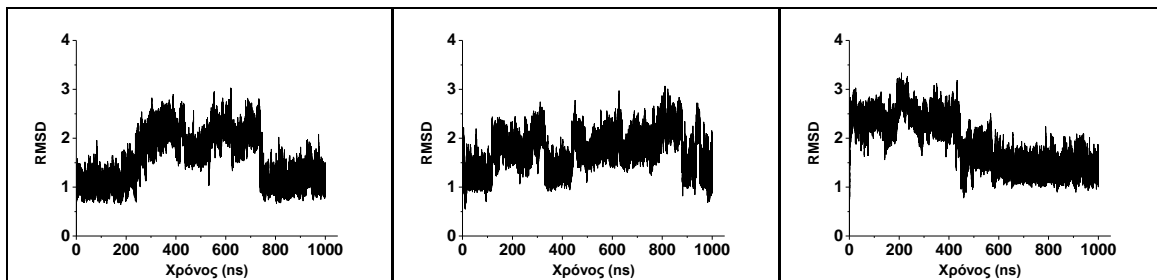
Σχ. 4.1 Η δομή 1Q3L.

Οι δομές 1KNE και 1KNA έχουν ακριβώς τα ίδια χαρακτηριστικά με την προαναφερθείσα 1Q3L, τόσο όσον αφορά τον αριθμό των αμινοξέων που περιέχουν οι επιμέρους αλυσίδες, αλλά και όσον αφορά τον τρόπο με τον οποίο είναι οργανωμένη η δευτεροταγής δομή τους. Μοναδική διαφοροποίηση αυτών των δύο δομών είναι ότι η λυσίνη 9 της H3 στην πρώτη περίπτωση έχει υποστεί τριμεθυλίωση, ενώ στην δεύτερη έχει διμεθυλιωθεί. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι και οι τρεις κρυσταλλογραφικές δομές που χρησιμοποιήθηκαν ως βάση στην παρούσα μελέτη παρήχθησαν με μέθοδο X-Ray.



Σχ. 4.2 Η δομή 1Q3L. Με πορτοκαλί χρώμα φαίνεται η HP1, ενώ με μπλε χρώμα η H3, όπου στον κόκκινο κύκλο διακρίνουμε το ξεδίπλωμα της α-έλικας.

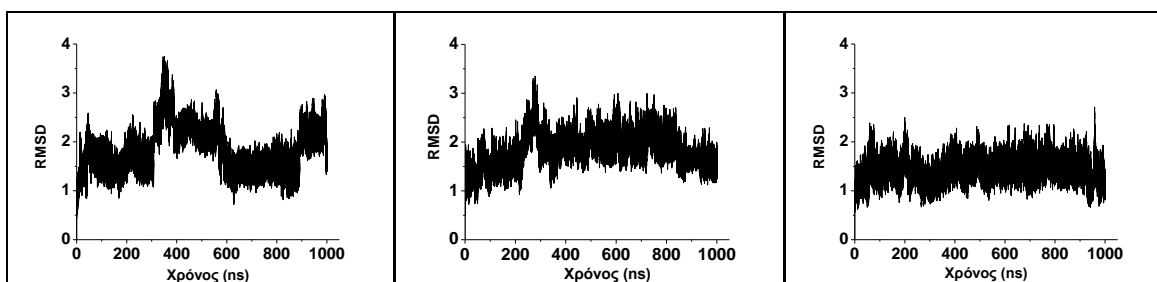
Προκειμένου να δειχθεί ότι τα συστήματά μας βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία πραγματοποιούμε την απεικόνιση κάποιων παραμέτρων, που λειτουργούν ως δείκτες σταθερότητας του συστήματος. Οι ποσότητες που επιλέξαμε να υπολογίσουμε είναι η μέση τετραγωνική μετατόπιση (RMSD) και η συνάρτηση σφαιρικής κατανομής (RDF) για την αλληλεπίδραση μεταξύ των ατόμων του οξυγόνου για τα μόρια του νερού που βρίσκονται στο σύστημα (σχήμα 4.3 και 4.5). Η ομαλή μεταβολή στην διακύμανση της τιμής του RMSD, κατά την χρονική εξέλιξη του συστήματος, γύρω από μια θέση ισορροπίας μας δίνει βάσιμες ενδείξεις για πραγματοποίηση ικανοποιητικού χρόνου στην προσομοίωση μας. Στα γραφήματα παρατηρούμε ότι σε κάποιες περιπτώσεις εμφανίζεται μεγάλη διακύμανση στην τιμή του RMSD. Το αποτέλεσμα αυτό δεν ισοδυναμεί με μη σταθεροποίηση της προσομοίωσης διότι λεπτομερέστερη ανάλυση της τροχιάς δείχνει ότι οφείλεται σε ξεδίπλωμα της α-έλικας που βρίσκεται στην άκρη της αλυσίδας της HP1 και δεν επηρεάζει την περιοχή του κλωβού που μελετάμε. Έτσι δείχνουμε και διαγράμματα χωρίς να λαμβάνουμε υπόψιν τα 15 αμινοξέα που βρίσκονται στην ελικοειδή μορφή και πραγματοποιούμε εκ νέου μέτρηση της παραμέτρου και εκτιμάμε την σταθερότητα της (σχήμα 4.4). Στον παραπάνω δείκτη αν προστεθεί και η ταύτιση του γραφήματος της RDF με πειραματικά δεδομένα οδηγούμαστε με μεγαλύτερη ασφάλεια στο συμπέρασμα της σωστά πραγματοποιημένης προσομοίωσης.



α)

β)

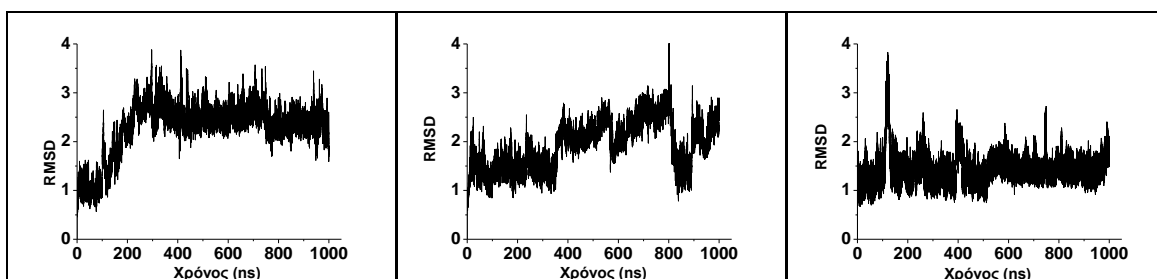
γ)



δ)

ε)

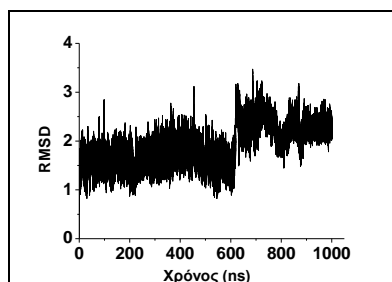
στ)



ζ)

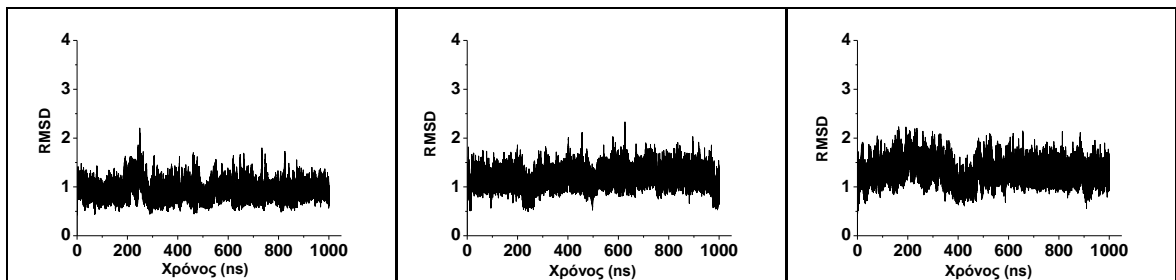
η)

θ)



ι)

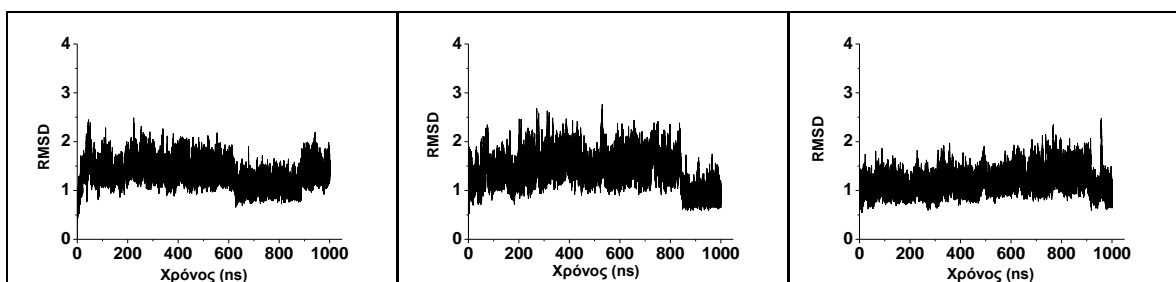
Σχ. 4.3 Τα διαγράμματα rmsd σε συνάρτηση με το χρόνο για τις περιπτώσεις: α) RKmeS β) RKme₂S γ) RKme₃S δ) RKmeSphos ε) RKme₂Sphos στ) RKme₃Sphos ζ) Rme₂KmeSphos η) Rme₃Kme₂Sphos θ) GKmeSphos ι) GKme₃Sphos.



α)

β)

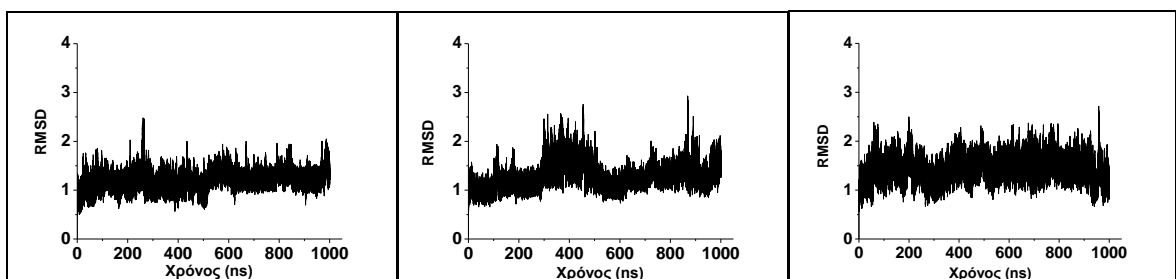
γ)



δ)

ε)

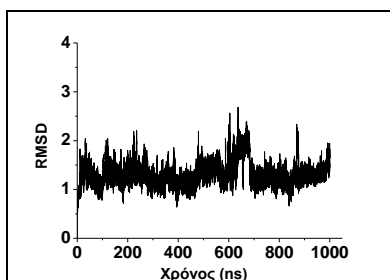
στ)



ζ)

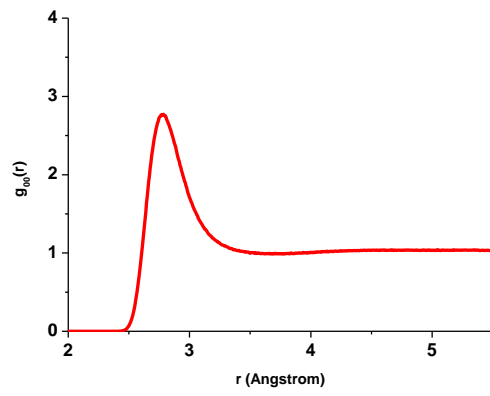
η)

θ)

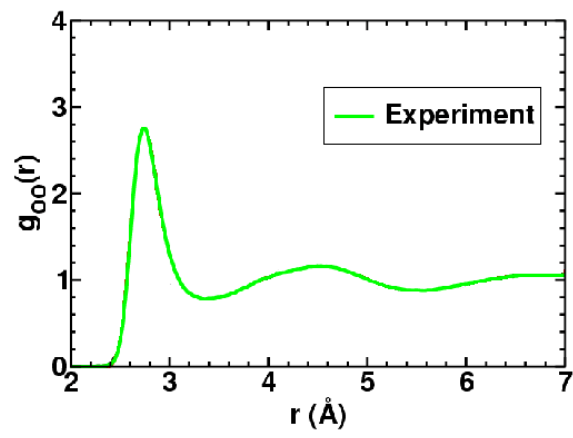


ι)

Σχ. 4.4 Τα διαγράμματα rmsd: α) RKmeS β) RKme₂S γ) RKme₃S δ) RKmeSphos ε) RKme₂Sphos στ) RKme₃Sphos ζ) Rme₂KmeSphos η) Rme₃Kme₂Sphos θ) GKmeSphos ι) GKme₃Sphos χωρίς να λαμβάνουμε υπόψιν την ελικοειδή διαμόρφωση στα άκρα της HP1.



α)



β)

Σχ. 4.5 Συνάρτηση σφαιρικής κατανομής g_{oo} του νερού α) για την RKme₃Sphos μετά την προσομοίωση μοριακής δυναμικής β) πειραματική.

4.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

4.3.1 Τροποποιήσεις της λυσίνης 9 και σερίνης 10

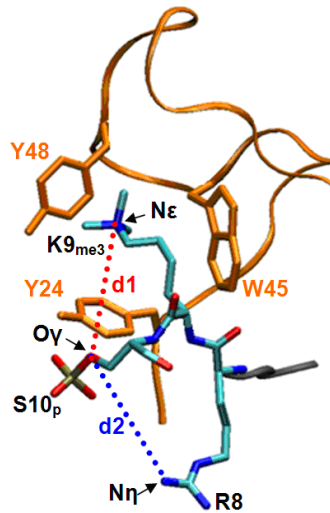
Τα αποτελέσματα μπορούν να χωριστούν σε 2 κύριες κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία έχουμε τα αποτελέσματα που περιλαμβάνουν δομικά χαρακτηριστικά των συστημάτων, όπως είναι αποστάσεις μεταξύ αμινοξέων και εύρεση ενδεικτικών δομών, ενώ στη δεύτερη κατηγορία έχουμε τα αποτελέσματα που δείχνουν τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου.

4.3.1.1 Δομικά χαρακτηριστικά

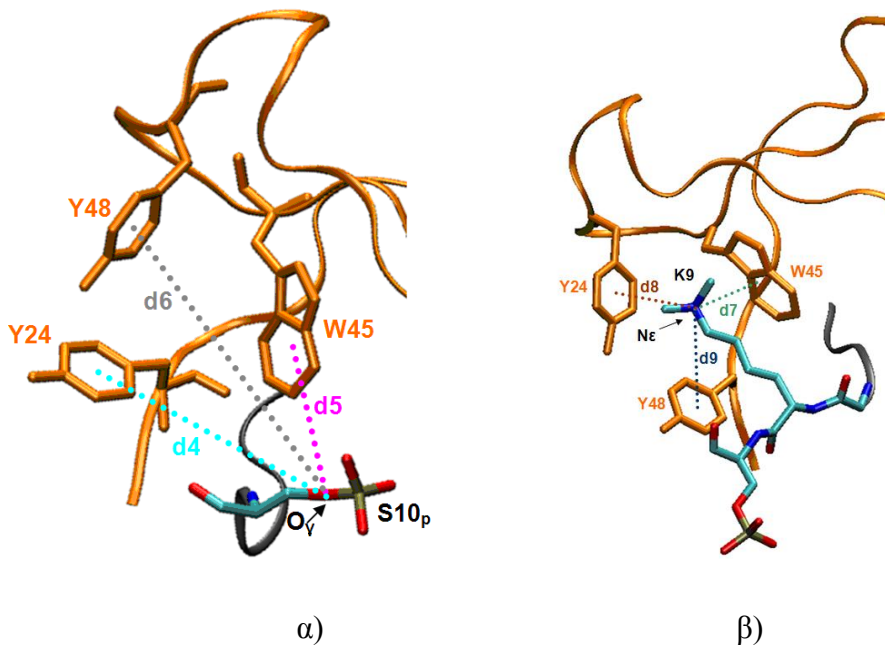
Στα σχήματα 4.8 έως 4.25 φαίνεται η αλληλεπίδραση της σερίνης με την λυσίνη και την αργινίνη στην ιστόνη H3 (αποστάσεις d1 και d2 αντίστοιχα στο σχ.4.6), καθώς επίσης και της λυσίνης και της σερίνης από το κέντρο των αρωματικών δακτυλίων (αποστάσεις d4-d9 στο σχ.4.7). Πιο συγκεκριμένα η απόσταση d1 ορίζεται μεταξύ των αζώτου Ne της λυσίνης 9 και του οξυγόνου Og της σερίνης 10, ενώ η απόσταση d2 ορίζεται μεταξύ του αζώτου Nh της αργινίνης 8 και του οξυγόνου Og της σερίνης 10. Οι αποστάσεις d4-d6 ορίζονται μεταξύ του Og της σερίνης και των κέντρων των αρωματικών δακτυλίων του κλωβού, ενώ οι αποστάσεις d7-d9 ορίζονται μεταξύ του Ne και των ιδίων κέντρων. Προτιμήθηκαν τα παραπάνω άτομα για να μετρηθούν οι μεταξύ των αμινοξέων αποστάσεις ώστε να είναι τα αποτελέσματα συγκρίσιμα όταν η σερίνη είναι τροποποιημένη και όταν αυτή δεν έχει υποστεί φωσφορυλίωση.

Στα γραφήματα αυτά (4.8 έως 4.25) χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση κατανομής πιθανότητας για τον υπολογισμό της απόστασης μεταξύ των προαναφερθέντων ατόμων. Ο λόγος για τον οποίο έγινε χρήση αυτής της ποσότητας και δεν παρουσιάστηκε ένα διάγραμμα απόστασης με χρόνο είναι ότι με αυτό τον τρόπο παρουσίασης των

αποτελεσμάτων είμαστε σε θέση να έχουμε μια καλύτερη αίσθηση για τα ποσοστά του χρόνου στα οποία είναι κοντά ή βρίσκονται απομακρυσμένα τα δύο κατάλοιπα, που στην ουσία είναι και το στοιχείο που μας ενδιαφέρει και όχι οι χρονικές περιόδοι κατά τις οποίες συμβαίνει αυτό.



Σχ.4.6 Απεικόνιση της απόστασης μεταξύ της λυσίνης και της σερίνης (d1) και της αργινίνης και της σερίνης (d2). Η απεικόνιση έγινε με το πρόγραμμα VMD.

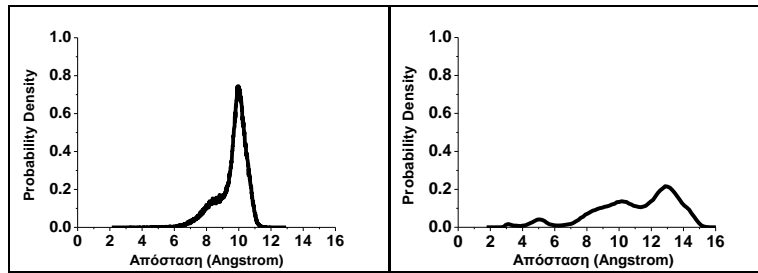


Σχ.4.7 Απεικόνιση της απόστασης μεταξύ α) της σερίνης από τους δακτυλίους και β) της λυσίνης από τους δακτυλίους.

Τα γραφήματα αυτά μπορούν να χωριστούν σε δυο κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία έχουμε αυτά που αντιστοιχούν σε μη φωσφορυλιωμένη σερίνη και στην δεύτερη κατηγορία αυτά που προκύπτουν μετά από φωσφορυλίωση της σερίνης 10.

Στα σχήματα 4.8-4.16 βλέπουμε ότι στην περίπτωση που δεν έχουμε φωσφορυλίωση της σερίνης η απόσταση μεταξύ της σερίνης και της λυσίνης βρίσκεται μεταξύ 6 και 11 Å. Τον περισσότερο χρόνο η απόσταση μεταξύ αυτών των 2 αμινοξέων βρίσκεται στα 10 Å. Εξαίρεση αποτελεί η περίπτωση της διμεθυλίωσης της λυσίνης όπου η ίδια απόσταση κυμαίνεται μεταξύ 8 και 11 Å με το μεγαλύτερο διάστημα να βρίσκεται πάλι όμως στα 10 Å. Ακόμα η απόσταση μεταξύ της αργινίνης και της σερίνης είναι από 7 έως 15 Å παρουσιάζοντας 2 επικρατέστερες αποστάσεις στα 10 και στα 13 Å με την δεύτερη να είναι αυτή που συναντάται συχνότερα στην τροχιά. Επίσης διακρίνουμε την απόσταση μεταξύ της λυσίνης και των κέντρων των αρωματικών δακτυλίων που σχηματίζουν τον κλωβό να είναι μεταξύ 4 και 6 Å με επικρατέστερη την απόσταση των 5 Å. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η περίπτωση της απόστασης μεταξύ της λυσίνης και του κέντρου της τρυπτοφάνης 45 στην περίπτωση της τριμεθυλίωσης της λυσίνης, όπου η ίδια απόσταση εντοπίζεται μεταξύ 6 και 8 Å με τα 7 Å να είναι η επικρατέστερη τιμή. Παρατηρούμε επίσης την απόσταση μεταξύ της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 24 να είναι μεταξύ 8 και 12 Å, ενώ αυτή της σερίνης με την τρυπτοφάνη 45 να είναι μεταξύ 7 και 11 Å. Τέλος η απόσταση μεταξύ της σερίνης και της τυροσίνης 48 είναι μεταξύ 7 και 11 Å στην περίπτωση της μονομεθυλίωσης της λυσίνης και μεταξύ 10 και 16 Å στις άλλες δυο περιπτώσεις.

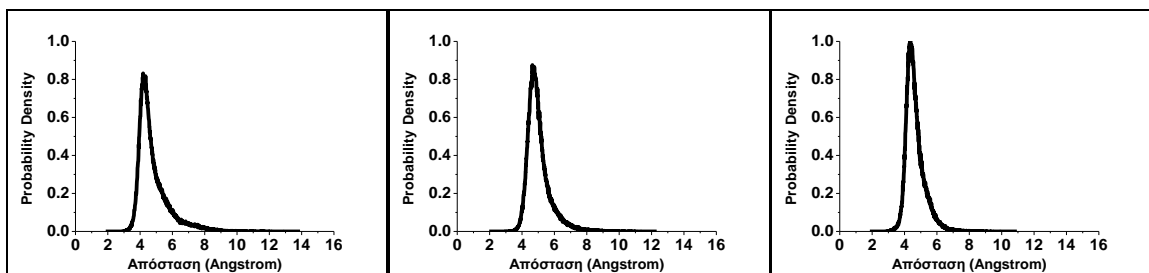
Στις περιπτώσεις που έχουμε παράλληλη φωσφορυλίωση της σερίνης (σχήματα 4.17-4.25) παρατηρούμε την απόσταση μεταξύ της λυσίνης και της σερίνης να είναι σε ελαφρώς ψηλότερη τιμή, μεταξύ 7 και 13 Å (με την περίπτωση της διμεθυλίωσης να συναντάμε και αποστάσεις στα 14 Å) με επικρατέστερη απόσταση στην τροχιά αυτή των 11 Å. Η απόσταση μεταξύ της σερίνης και της αργινίνης είναι ανάμεσα από 3 και 5 Å και τον περισσότερο χρόνο είναι 3.5 Å. Για τις περιπτώσεις των αποστάσεων μεταξύ της λυσίνης, καθώς και της σερίνης από τα κέντρα των αρωματικών δακτυλίων των αμινοξέων του κλωβού η απόσταση παρουσιάζει συμπεριφορά ανάλογη με αυτή που έχουμε στην περίπτωση που απουσιάζει η φωσφορική ομάδα στην σερίνη.



α)

β)

Σχ. 4.8 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της λυσίνης και της σερίνης και β) της αργινίνης με τη σερίνη για την περίπτωση RKmeS.

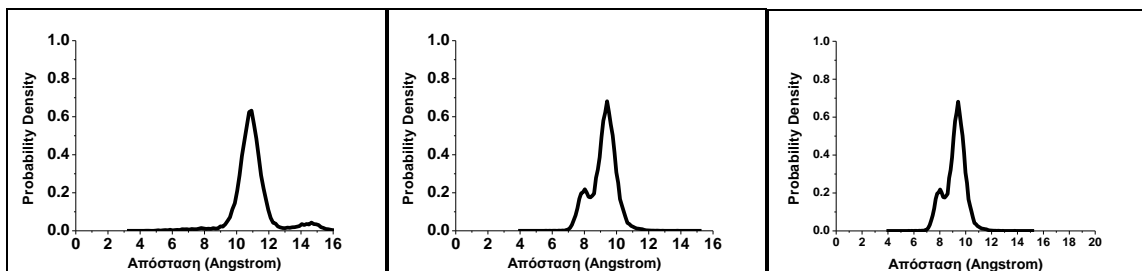


α)

β)

γ)

Σχ. 4.9 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 24 β) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης 45 και γ) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 48 για την περίπτωση RKmeS.

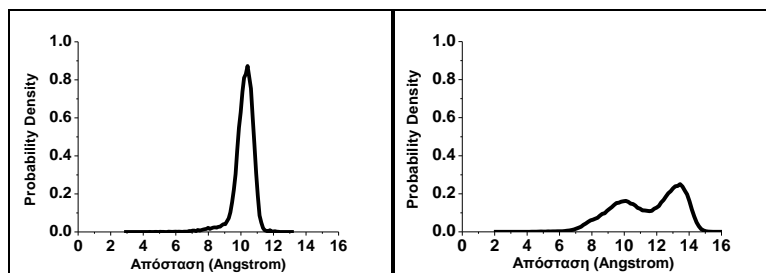


α)

β)

γ)

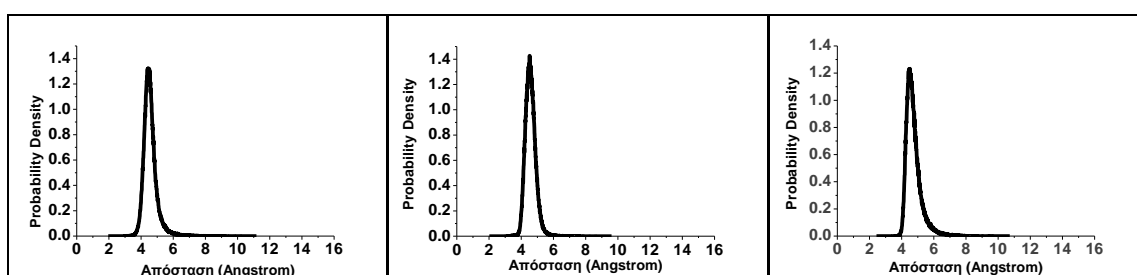
Σχ. 4.10 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 24 β) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης 45 και γ) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 48 για την περίπτωση RKmeS.



α)

β)

Σχ. 4.11 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της λυσίνης και της σερίνης και β) της αργινίνης με τη σερίνη για την περίπτωση RKme₂S.

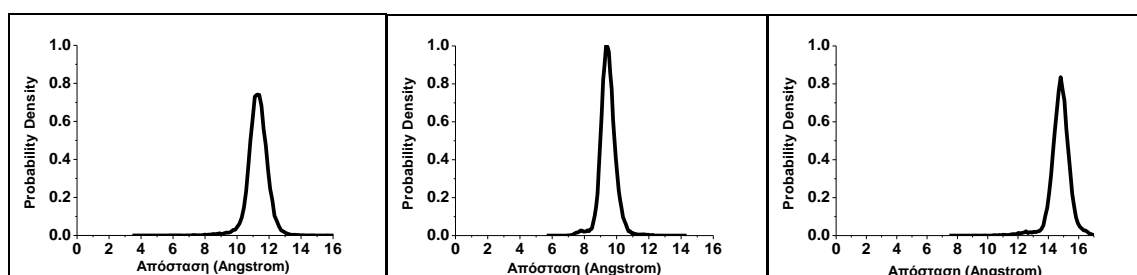


α)

β)

γ)

Σχ. 4.12 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 24 β) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης 45 και γ) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 48 για την περίπτωση RKme₂S.

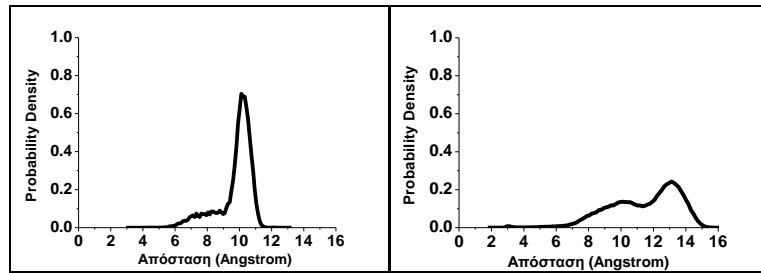


α)

β)

γ)

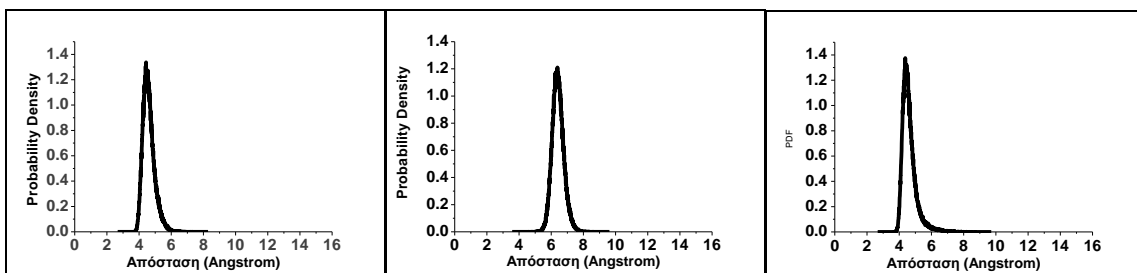
Σχ. 4.13 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 24 β) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης 45 και γ) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 48 για την περίπτωση RKme₂S.



α)

β)

Σχ. 4.14 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της λυσίνης και της σερίνης και β) της αργινίνης με τη σερίνη για την περίπτωση RKme₃S.

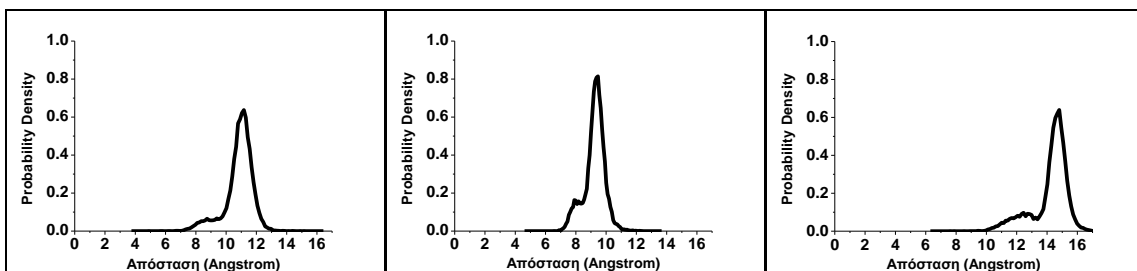


α)

β)

γ)

Σχ. 4.15 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 24 β) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης 45 και γ) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 48 για την περίπτωση RKme₃S.

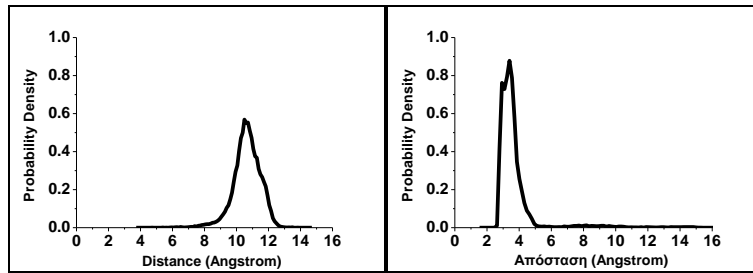


α)

β)

γ)

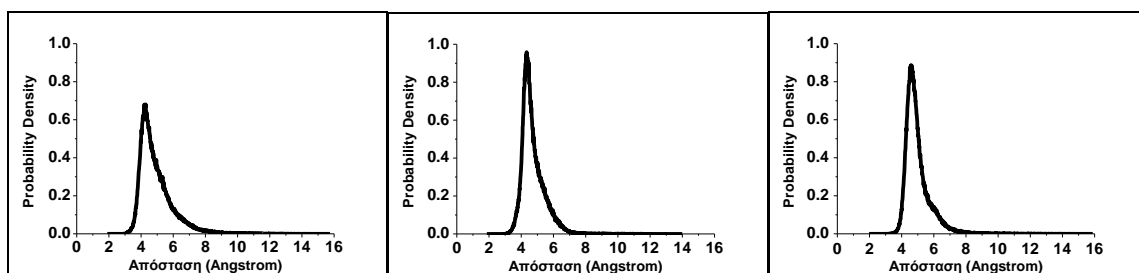
Σχ. 4.16 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 24 β) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης 45 και γ) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 48 για την περίπτωση RKme₃S.



α)

β)

Σχ. 4.17 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της λυσίνης και της σερίνης και β) της αργινίνης με της σερίνη για την περίπτωση RKmeSphos.

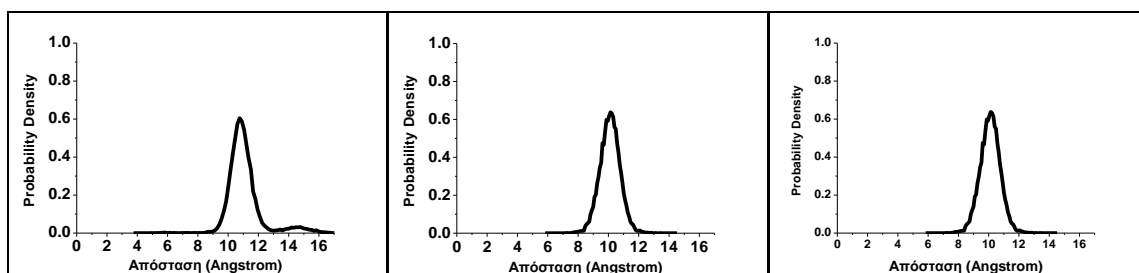


α)

β)

γ)

Σχ. 4.18 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 24 β) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης 45 και γ) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 48 για την περίπτωση RKmeSphos.

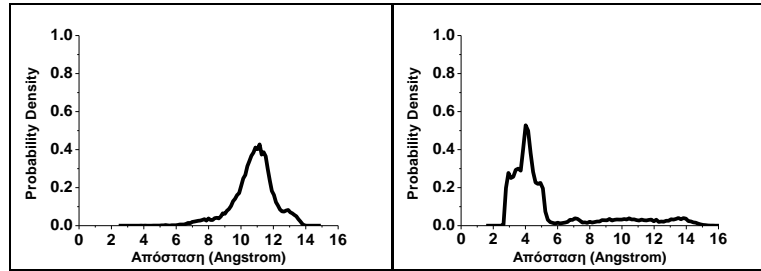


α)

β)

γ)

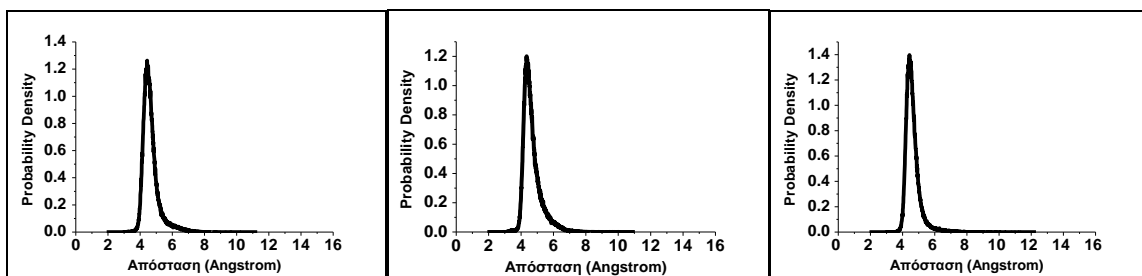
Σχ. 4.19 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 24 β) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης 45 και γ) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 48 για την περίπτωση RKmeSphos.



α)

β)

Σχ. 4.20 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της λυσίνης και της σερίνης και β) της αργινίνης με της σερίνη για την περίπτωση RKme₂Sphos.

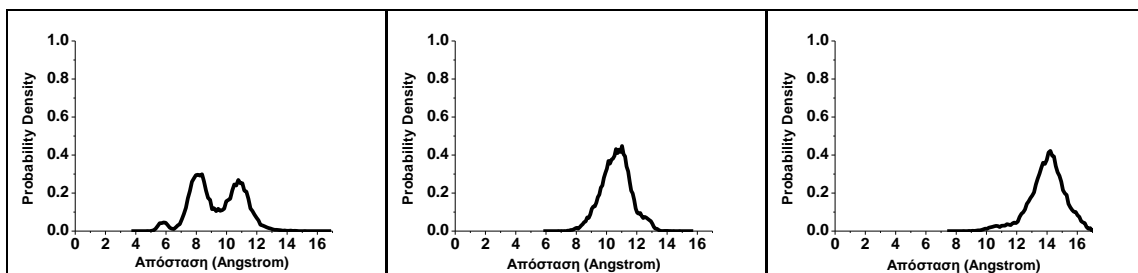


α)

β)

γ)

Σχ. 4.21 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 24 β) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης 45 και γ) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 48 για την περίπτωση RKme₂Sphos.

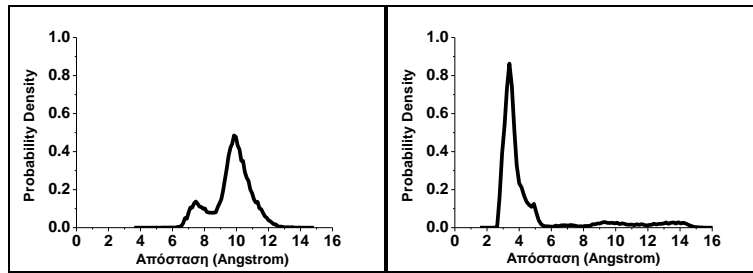


α)

β)

γ)

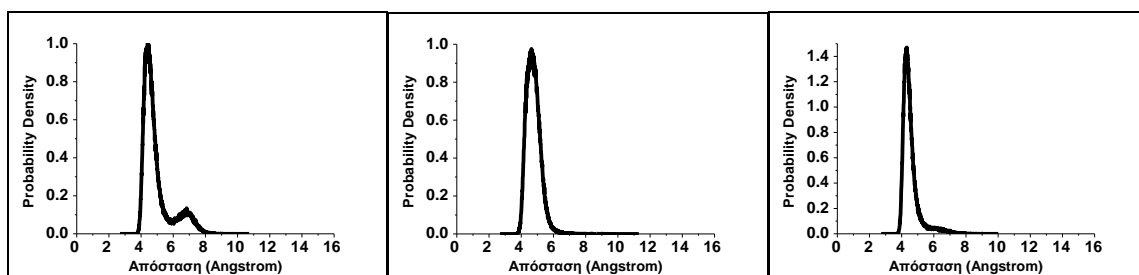
Σχ. 4.22 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της σερίνη και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 24 β) της σερίνη και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης 45 και γ) της σερίνη και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 48 για την περίπτωση RKme₂Sphos.



α)

β)

Σχ. 4.23 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της λυσίνης και της σερίνης και β) της αργινίνης με της σερίνη για την περίπτωση RKme₃Sphos.

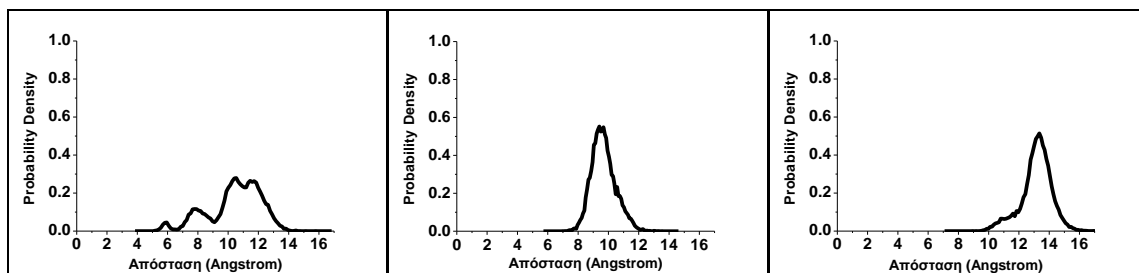


α)

β)

γ)

Σχ. 4.24 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 24 β) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης 45 και γ) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 48 για την περίπτωση RKme₃Sphos.



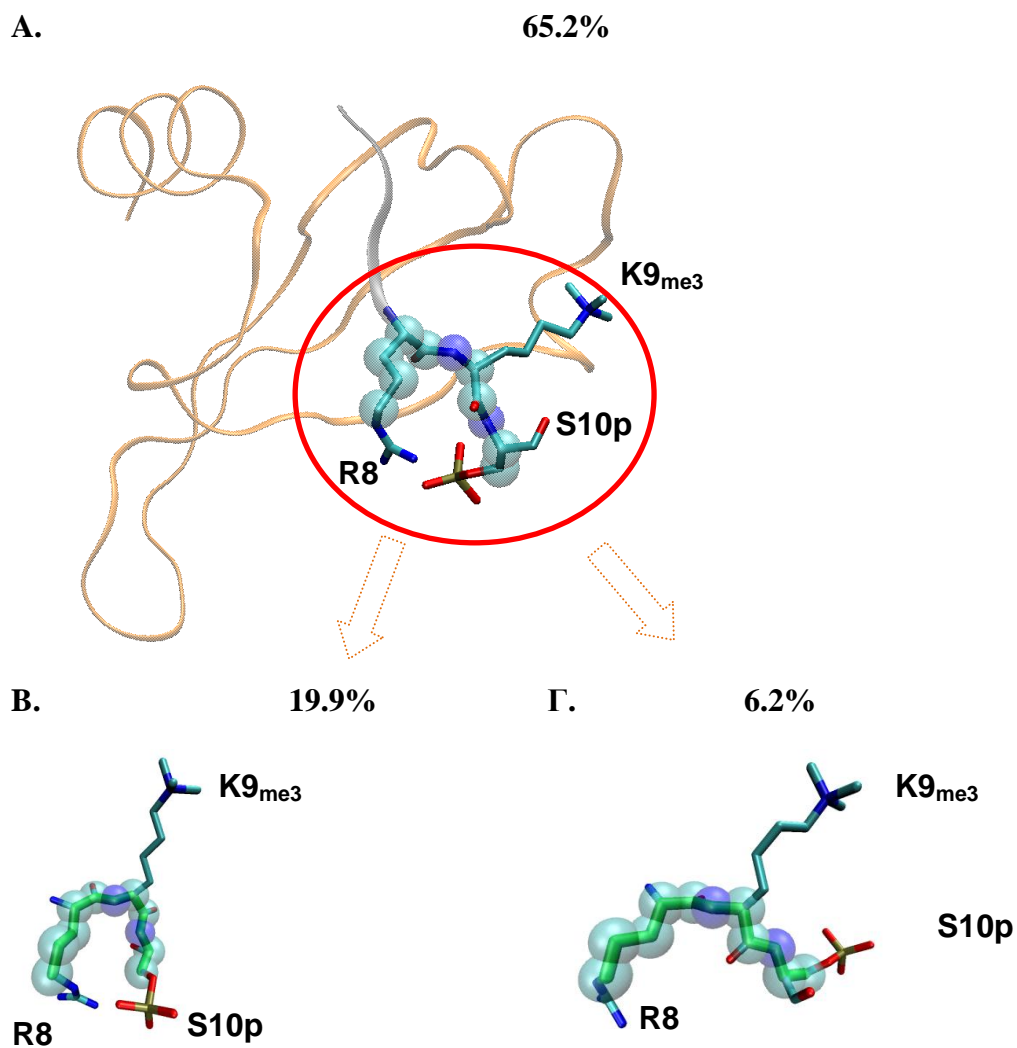
α)

β)

γ)

Σχ. 4.25 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 24 β) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης 45 και γ) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 48 για την περίπτωση RKme₃Sphos.

Από την λεπτομερή παρατήρηση αυτών των γραφημάτων βλέπουμε ότι η τροποποιημένη λυσίνη 9 που δεσμεύεται εντός των αρωματικών δακτυλίων επηρεάζεται ελάχιστα από την φύση της τροποποίησης που έχει (μόνο, δι ή τρι μεθυλίωση), επιπλέον η παρουσία ή μη της φωσφορυλιομάδας επηρεάζει ελάχιστα την αλληλεπίδραση αυτή. Από το αποτέλεσμα αυτό μπορούμε να θεωρήσουμε ότι και στις 6 περιπτώσεις που μελετήθηκαν αρχικά, η τροποποιημένη λυσίνη 9, που ουσιαστικά είναι το σημείο σύνδεσης της H3 με την HP1 δεν αποσυνδέεται από τον αρωματικό κλωβό στον οποίο είναι εγκλωβισμένη. Ακόμη δεν παρατηρήθηκε καμία αλληλεπίδραση της λυσίνης 9 με την σερίνη 10 ακόμα και όταν αυτή έχει υποστεί φωσφορυλίωση. Ένα πολύ σημαντικό εύρημα από την ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι η έντονη αλληλεπίδραση της αργινίνης 8 με την σερίνη 10 όταν αυτή υποστεί φωσφορυλίωση. Τα παραπάνω γραφήματα δείχνουν ότι η απόσταση μεταξύ της σερίνης 10 και της αργινίνης 8 όταν είναι τροποποιημένη η πρώτη είναι μεταξύ 3 και 5 Å, ενώ σε αντίθετη περίπτωση αυξάνεται δραματικά στα 8 με 10 Å. Το γεγονός αυτό για παράδειγμα στη περίπτωση της τριμεθυλίωσης με παράλληλη φωσφορυλίωση δίνει τρεις κυρίαρχες δομές κατά την χρονική εξέλιξη του συστήματος (σχ. 4.26). Τα άτομα που επιλέχθηκαν για την εύρεση αυτών των δομών καθώς και οι διεδρες γωνίες που «επιβάλλουν» αυτές της δομές φαίνονται στον πίνακα 4.2. Στο σχήμα 4.26 είναι ορατή η εμφάνιση μιας δομής σε σχήμα Π μεταξύ των αμινοξέων της αργινίνης 8, της λυσίνης 9 και της σερίνης 10. Το χρονικό διάστημα κατά την χρονική εξέλιξη του συστήματος μάλιστα για το οποίο παρατηρείται αυτό το φαινόμενο είναι άκρως εντυπωσιακό και ξεπερνάει το 85% της τροχιάς. Ακόμη ερευνήθηκε και η αλληλεπίδραση μεταξύ της σερίνης και των αρωματικών δακτυλίων. Η σπουδαιότητα αυτών των αποτελεσμάτων έγκειται στο γεγονός ότι έχουν αναφερθεί και στην βιβλιογραφία για τον έλεγχο του διπλώματος ή μη συνθετικών πολυπεπτιδίων που μιμούνται τα συστήματα της παρούσας εργασίας [35,127]. Από τα γραφήματα αυτά μπορούμε να διακρίνουμε την έλλειψη οποιασδήποτε αλληλεπίδρασης της σερίνης 10 με τους δακτυλίους ακόμα και όταν αυτή έχει τροποποιηθεί. Το γεγονός αυτό μας ωθεί στο συμπέρασμα ότι η αλληλεπίδραση R8-S10 είναι πάρα πολύ ισχυρή και δεν επιτρέπει αλληλεπίδραση της σερίνης 10 με τους δακτυλίους.



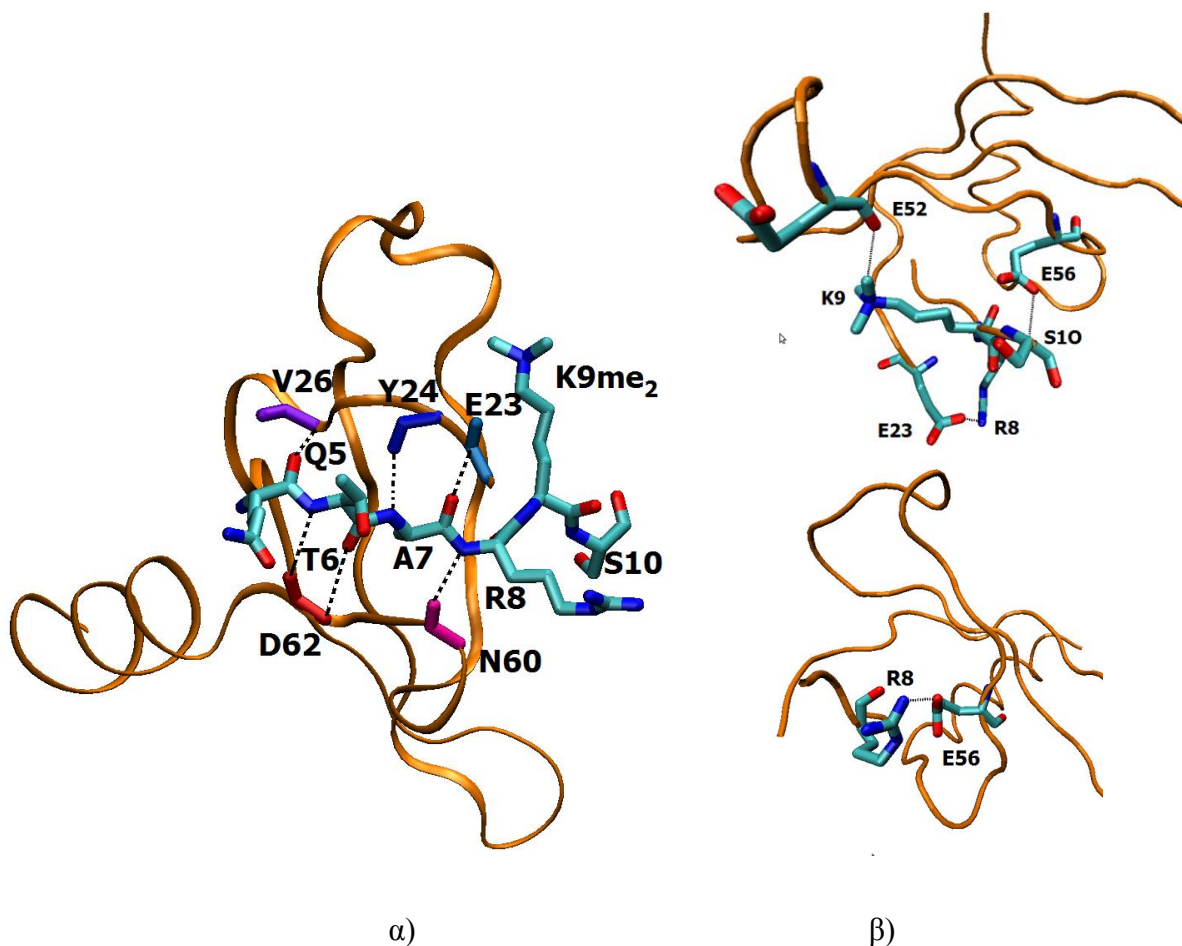
Σχ. 4.26 Οι τρεις κυρίαρχες δομές στην περίπτωση της τριμεθυλιωμένης λυσίνης

Διέδρες γωνίες	A	B	Γ
8CD-8CG-8CB-8CA	-154	-153	-176
8C-8CA-8CB-8CG	67	160	165
9N-8C-8CA-8CB	-108	-108	-80
9CA-9N-8C-8CA	176	-173	175
9C-9CA-9N-8C	-96	-80	-102
10N-9C-9CA-9N	156	-27	-177
10CA-10N-9C-9CA	153	176	-178
10CB-10CA-10N-9C	164	158	152

Πίνακας 4.2 Οι τιμές των διεδρων γωνιών των ατόμων που δίνουν τις αντιπροσωπευτικές δομές.

4.3.1.2 Δεσμοί υδρογόνου

Επίσης με αφορμή την ύπαρξη δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αμινοξέων της H3 και αυτών της HP1, που βρέθηκαν κρυσταλλογραφικά από τους Khorasanizadeh και Jacobs [35] και φαίνεται να σταθεροποιούν την μεταξύ τους σύνδεση έγινε μια περαιτέρω μελέτη της ύπαρξης και επιπλέον δεσμών υδρογόνου κατά την χρονική εξέλιξη του συστήματος (σχ. 4.27). Για την εύρεση αυτών των δεσμών χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια της απόστασης έως 3.2 Å και γωνίας έως 120°. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στα σχήματα 4.28 έως 4.33.



Σχ. 4.27 Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου, α) είναι οι δεσμοί που βρέθηκαν στην κρυσταλλογραφική δομή και β) που βρέθηκαν κατά την διάρκεια της προσομοίωσης.

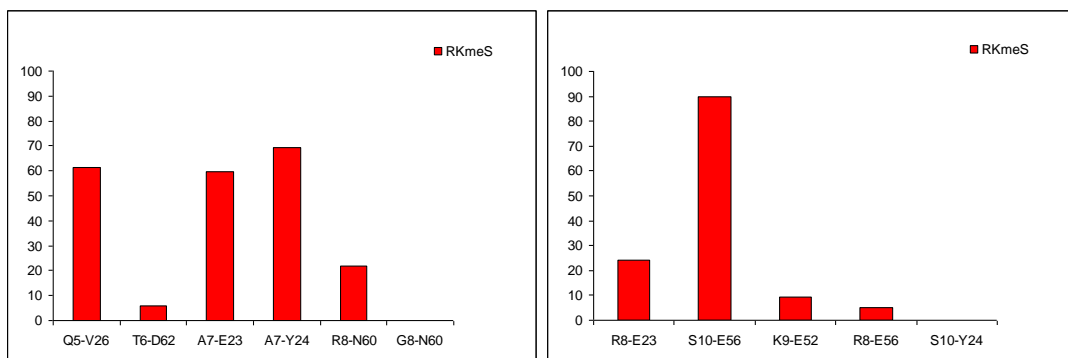
Τα αποτελέσματα και σε αυτή την περίπτωση μπορούν να χωριστούν πάλι σε δυο κατηγορίες. Σε αυτά που υπάρχει φωσφορική ομάδα στη σερίνη και σε αυτά που

απουσιάζει. Στα σχήματα 4.28-4.30 είναι τα αποτελέσματα της πρώτης περίπτωσης, όπου διακρίνουμε την γλουταμίνη 5 της H3 να σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την βαλίνη 26 της HP1 για ποσοστό χρόνου μεγαλύτερο του 60%, την θρεονίνη 6 της H3 με το ασπαρτικό οξύ 62 της HP1 για πολύ μικρό ποσοστό του χρόνου, κάτω του 10%. Ακόμη η Αλανίνη 7 της H3 με το γλουταμικό οξύ 23 και την τυροσίνη 24 της HP1 για ποσοστά πλησίον του 60% και μεγαλύτερο του 70% αντίστοιχα. Ακόμη βλέπουμε ότι η αργινίνη 8 με την ασπαραγίνη 60 σχηματίζουν δεσμό υδρογόνου για το 20% του χρόνου στις περιπτώσεις της μόνο και τρι-μεθυλίωσης και κάτω του 10% στην περίπτωση της δι-μεθυλίωσης. Οι δεσμοί αυτοί εντοπίστηκαν κρυσταλλογραφικά από τους Khorasanizadeh και Jacobs. Όμως κατά την μοριακή δυναμική του συστήματος εντοπίστηκαν επιπλέον και οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της αργινίνης 8 και του γλουταμικού οξέος 23 για περίπου 30% της τροχιάς, αλλά και ένας πάρα πολύ ισχυρός δεσμός μεταξύ της σερίνης 10 και του γλουταμικού οξέος 56 περίπου για το 90% της τροχιάς.

Στα σχήματα 4.31 – 4.33 όπου έχουμε και παράλληλη φωσφορυλίωση της σερίνης ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ της γλουταμίνης 5 της H3 και της βαλίνης 26 της HP1 εμφανίζεται για διάστημα μικρότερο του 50% της τροχιάς, ο δεσμός της θρεονίνης 6 της H3 με το ασπαρτικό οξύ 62 της HP1 εμφανίζεται για ποσοστό περίπου 20% σε όλες τις περιπτώσεις. Ακόμη η Αλανίνη 7 της H3 με το γλουταμικό οξύ 23 της HP1 σχηματίζει δεσμό για ποσοστό από 30- 40% της τροχιάς, ενώ με την τυροσίνη 24 της HP1 από 40-50% της τροχιάς. Επίσης το ποσοστό εμφάνισης του δεσμού υδρογόνου μεταξύ της αργινίνης 8 της H3 και του ασπαρτικού οξέος 60 της HP1 δεν ξεπερνάει το 20% της τροχιάς. Τέλος κατά την μοριακή δυναμική του συστήματος και σε αυτή την περίπτωση σχηματίζονται επιπλέον δεσμοί υδρογόνου. Οι δεσμοί αυτοί είναι μεταξύ της αργινίνης 8 της H3 και του γλουταμικού οξέος 56 της HP1 για ποσοστά περίπου 70%, 20% και 50% της τροχιάς στις περιπτώσεις της μόνο, δι και τριμεθυλίωσης αντίστοιχα. Ακόμη στις περιπτώσεις της μόνο και διμεθυλίωσης εμφανίζεται και δεσμός υδρογόνου μεταξύ της λυσίνης 9 της H3 και του γλουταμικού οξέος 56 της HP1 για χρονικό διάστημα περίπου 20% της τροχιάς και ένας τελευταίος δεσμός που εντοπίζεται είναι μεταξύ της αργινίνης 8 της H3 και του γλουταμικού οξέος 23 της HP1 στις περιπτώσεις της δι και τριμεθυλίωσης της λυσίνης για ποσοστά γύρω στο 10%.

Βλέποντας τα σχήματα αυτά διακρίνουμε μια μείωση της σταθερότητας των δεσμών αυτών (που βρέθηκαν από τους Khorasanizadeh και Jacobs) όταν έχουμε φωσφορυλίωση της

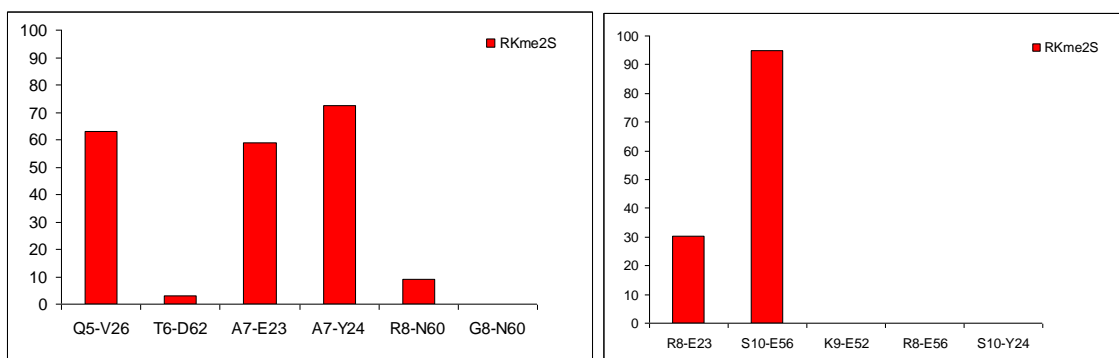
σερίνης ακόμα και στα κατάλοιπα, που είναι απομακρυσμένα από αυτό της σερίνης 10, όπως είναι για παράδειγμα η γλουταμίνη 5. Ο βασικός λόγος για τον οποίο συμβαίνει αυτό είναι ότι η αλληλεπίδραση R-S ωθεί το σύστημα προς συγκεκριμένες δομές, που διαφοροποιούνται σημαντικά σε σχέση με αυτές που προϋπήρχαν όταν απουσιάζει η φωσφορική ομάδα. Τέλος διακρίνουμε και τον ανταγωνιστικό ρόλο του γλουταμικού οξέος 56 όταν έχει υποστεί την τροποποίηση της φωσφορυλίωσης ή όχι η σερίνη 10. Πιο συγκεκριμένα παρατηρούμε ότι η τροποποιημένη σερίνη δεν αλληλεπιδρά με το γλουταμικό οξύ 56 της HP1 και αλληλεπιδρά έντονα η αργινίνη 8 με αυτό, ενώ σε αντίθετη περίπτωση παρουσιάζεται μια έντονη αλληλεπίδραση της σερίνης με το γλουταμικό οξύ. Αυτή η αλληλεπίδραση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δέσμευση της H3 από την HP1 και επιβεβαιώνεται και από πειραματικές μελέτες [35,118]



α)

β)

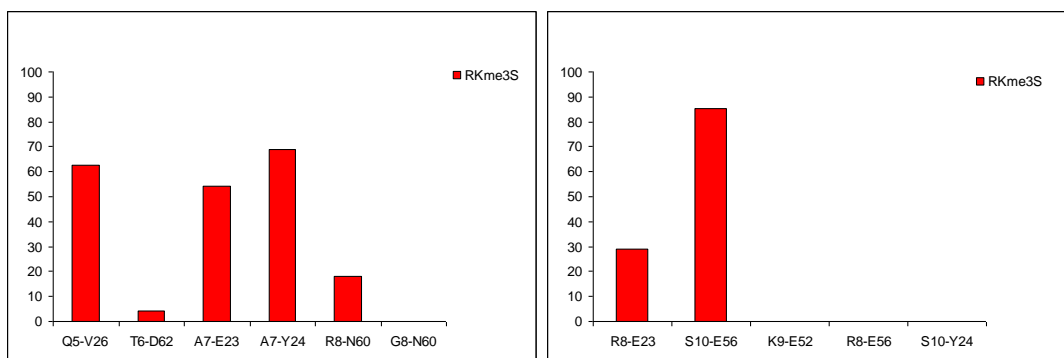
Σχ. 4.28 Δεσμοί υδρογόνου που εντοπίστηκαν α) από τους Khorasanizadeh και Jacobs και β) κατά την εξέλιξη του συστήματος για την περίπτωση RKmeS.



α)

β)

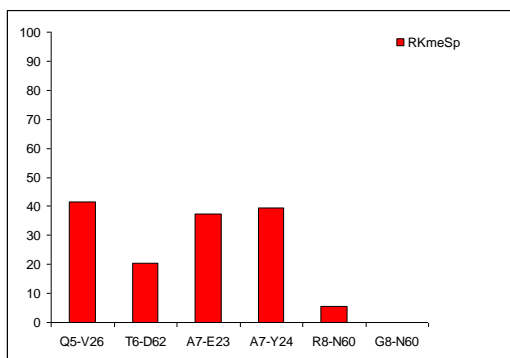
Σχ. 4.29 Δεσμοί υδρογόνου που εντοπίστηκαν α) από τους Khorasanizadeh και Jacobs και β) κατά την εξέλιξη του συστήματος για την περίπτωση RKme₂S.



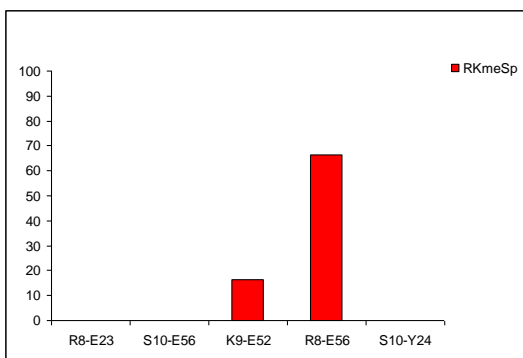
α)

β)

Σχ. 4.30 Δεσμοί υδρογόνου που εντοπίστηκαν α) από τους Khorasanizadeh και Jacobs και β) κατά την εξέλιξη του συστήματος για την περίπτωση RKme₃S.

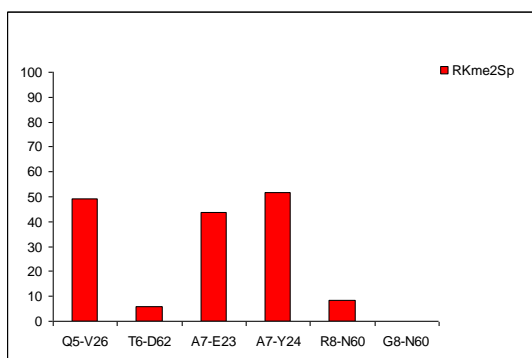


α)

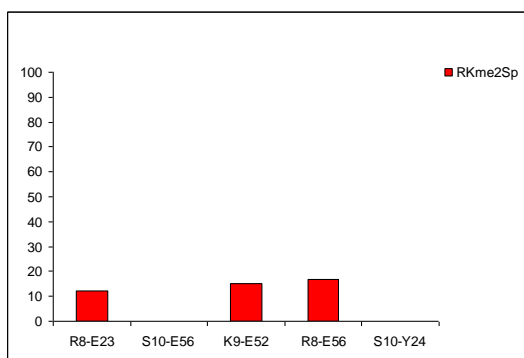


β)

Σχ. 4.31 Δεσμοί υδρογόνου που εντοπίστηκαν α) από τους Khorasanizadeh και Jacobs και β) κατά την εξέλιξη του συστήματος για την περίπτωση RKmeSphos.

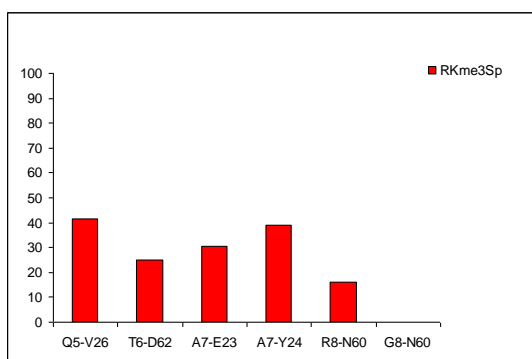


α)

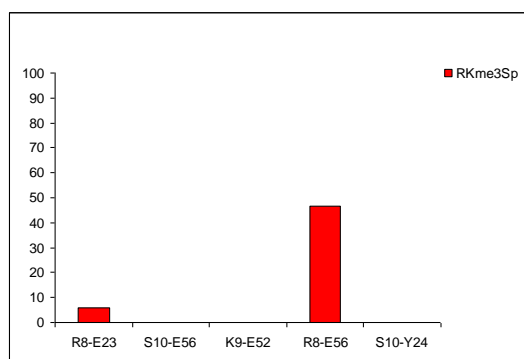


β)

Σχ. 4.32 Δεσμοί υδρογόνου που εντοπίστηκαν α) από τους Khorasanizadeh και Jacobs και β) κατά την εξέλιξη του συστήματος για την περίπτωση RKme₂Sphos.



α)



β)

Σχ. 4.33 Δεσμοί υδρογόνου που εντοπίστηκαν α) από τους Khorasanizadeh και Jacobs και β) κατά την εξέλιξη του συστήματος για την περίπτωση RKme₃Sphos.

4.3.2 Τροποποιήσεις της λυσίνης 9 και σερίνης 10 και ταυτόχρονη ασύμμετρη διμεθυλίωση της αργινίνης 8

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της παραγράφου 4.2.1 δείχνει μια έντονη αλληλεπίδραση της φωσφορυλιωμένης σερίνης με την αργινίνη, ενώ όταν απουσιάζει η φωσφορική ομάδα από τη σερίνη η αλληλεπίδραση αυτή παύει να υφίσταται. Μια αιτία αυτού του φαινομένου είναι ότι η φωσφορική ομάδα προσδίδει αρνητικό φορτίο στη σερίνη με αποτέλεσμα να ευνοείται η αλληλεπίδραση με την θετικά φορτισμένη αργινίνη. Προκειμένου να τροποποιήσουμε την κατανομή του θετικού φορτίου της αργινίνης πραγματοποιήσαμε διμεθυλίωσή της. Η προσομοίωση έγινε σε σύστημα που περιελάμβανε και ταυτόχρονη μονομεθυλίωση της λυσίνης για χρονικό διάστημα 500 ns. Επιπλέον εξετάσαμε και την περίπτωση διμεθυλιωμένης αργινίνης με τριμεθυλιωμένη λυσίνη για χρονικό διάστημα 1 μs. Και στις δυο περιπτώσεις η σερίνη 10 ήταν φωσφορυλιωμένη.

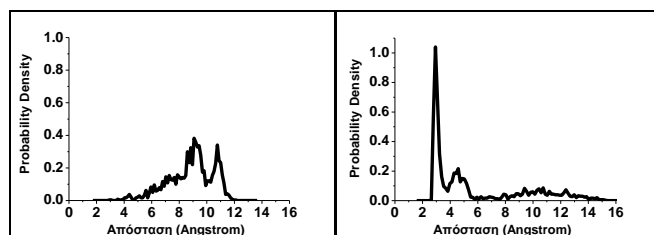
4.3.2.1 Δομικά χαρακτηριστικά

Στα σχήματα 4.34 έως 4.39 βλέπουμε πάλι γραφικές παραστάσεις που δείχνουν την αλληλεπίδραση της σερίνης με την αργινίνη και την λυσίνη στην ιστόνη H3, την αλληλεπίδραση της σερίνης με τους αρωματικούς δακτυλίους και τέλος την συμπεριφορά των «κλωβού» που σχηματίζουν οι αρωματικοί δακτύλιοι με την τροποποιημένη λυσίνη της ιστόνης H3. Τα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό αυτών των αποστάσεων είναι τα ίδια με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν και στην προηγούμενη ενότητα. Παρατηρώντας αυτά τα διαγράμματα βλέπουμε ανάλογη συμπεριφορά στις περιπτώσεις όπου η λυσίνη είναι μονο- ή τρι- μεθυλιωμένη.

Στα σχήματα 4.34 και 4.37 στην πρώτη γραφική παράσταση βλέπουμε την απόσταση μεταξύ της λυσίνης και της σερίνης να κυμαίνεται κοντά στα 8 Å για μεγάλο ποσοστό του χρόνου, ενώ για ένα πολύ σημαντικό χρονικό διάστημα η απόσταση αυτή είναι κοντά στα 10 Å. Στο δεύτερο διάγραμμα βλέπουμε την απόσταση μεταξύ της αργινίνης και της σερίνης να κυμαίνεται κοντά στα 3 Å για το μεγαλύτερο χρόνο της προσομοίωσης. Η

απόσταση αυτή μετρήθηκε μεταξύ του αζώτου Nη της αργινίνης και του οξυγόνου Oγ της σερίνης. Στα σχήματα 4.35 και 4.38 βλέπουμε τις αποστάσεις μεταξύ του αζώτου Ne της λυσίνης και του κέντρου των αρωματικών δακτυλίων των αμινοξέων της τυροσίνης 24, της τρυπτοφάνης 45 και της τυροσίνης 48. Το πρώτο διάγραμμα αυτών των σχημάτων δείχνει μια απόσταση μεταξύ της λυσίνης και της τυροσίνης 24 ανάμεσα από τα 3.5 και τα 7 Å με το μεγαλύτερο ποσοστό του χρόνου να εντοπίζεται στα 4.5 Å, ενώ για τις αποστάσεις μεταξύ της λυσίνης και των κέντρων των αρωματικών δακτυλίων της τρυπτοφάνης 45 και της τυροσίνης 48 η απόσταση αυτή μεταβάλλεται σε μια τιμή κοντά στα 5 Å σχεδόν για όλη την τροχιά. Στα σχήματα 4.36 και 4.39 βλέπουμε τις αποστάσεις μεταξύ του οξυγόνου Oγ της σερίνης και των κέντρων των αρωματικών δακτυλίων των τριών αμινοξέων του κλωβού. Στο πρώτο διάγραμμα, που δείχνει την απόσταση μεταξύ της σερίνης και της τυροσίνης 24 διακρίνουμε μια απόσταση μεταξύ 9 και 13 Å με το μεγαλύτερο χρόνο να είναι στα 10.5 Å, ενώ μόνο στην περίπτωση της τριμεθυλίωσης βρίσκουμε μια τιμή μικρότερη της προαναφερθείσας για ένα μικρό ποσοστό χρόνου. Στο δεύτερο διάγραμμα, που είναι η απόσταση μεταξύ της σερίνης και της τρυπτοφάνης 45 η απόσταση είναι μεταξύ 8 και 14 Å με το μεγαλύτερο χρόνο να βρίσκεται στα 10 Å, Τέλος στο τρίτο διάγραμμα που δείχνει την απόσταση μεταξύ της σερίνης από την τυροσίνη 48 η απόσταση παρουσιάζει μια διακύμανση μεταξύ 10 και 16 Å με το μεγαλύτερο χρόνο να απέχει 14 Å και ένα σημαντικό ποσοστό αυτού να βρίσκεται στα 11.5 Å.

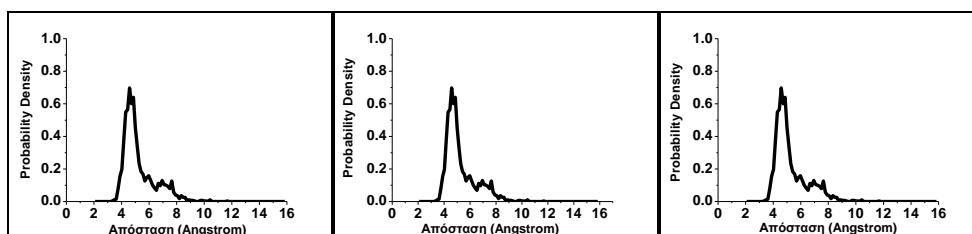
Παρατηρώντας τα διαγράμματα αυτά είναι ορατή η έντονη αλληλεπίδραση που εμφανίζεται και σε αυτή την περίπτωση μεταξύ της σερίνης 10 και της αργινίνης 8 σε μικρότερο όμως ποσοστό εμφάνισης από ότι στην περίπτωση που η αργινίνη είναι ατροποποιητή. Ακόμη βλέπουμε ότι λόγω της σταθερότητας αυτού του δεσμού δεν πραγματοποιείται καμία αλληλεπίδραση μεταξύ της λυσίνης και της σερίνης. Τέλος δεν διακρίνεται και καμία διαφοροποίηση στα αποτελέσματα όσον αφορά την αλληλεπίδραση των δακτυλίων με τα αμινοξέα της λυσίνης και της σερίνης. Πιο συγκεκριμένα η λυσίνη παραμένει εγκλωβισμένη εντός του κλωβού για όλη την τροχιά, ενώ η σερίνη δεν αλληλεπιδρά σε καμία χρονική στιγμή με αυτήν. Η ανάλυση των διαγραμμάτων αυτών μας ωθεί στο συμπέρασμα ότι η διμεθυλίωση της αργινίνης δεν είναι μια ικανή τροποποίηση που μπορεί να αποσταθεροποιήσει την αλληλεπίδραση της HP1 με την H3 ούτε μπορεί να δημιουργήσει διαφορετικές συνθήκες στην περιοχή του κλωβού.



α)

β)

Σχ. 4.34 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της λυσίνης και της σερίνης και β) της αργινίνης με της σερίνη για την περίπτωση Rme₂KmeSphos.

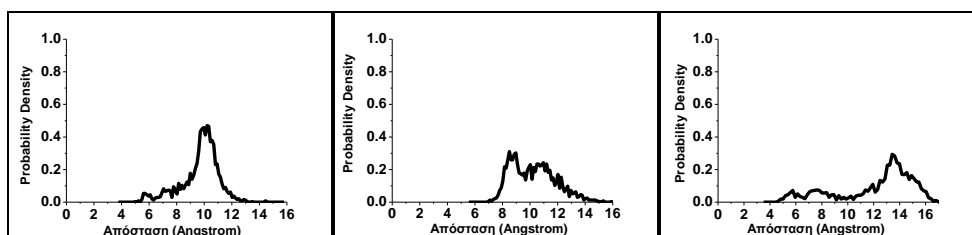


α)

β)

γ)

Σχ. 4.35 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 24 β) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης 45 και γ) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 48 για την περίπτωση Rme₂KmeSphos.

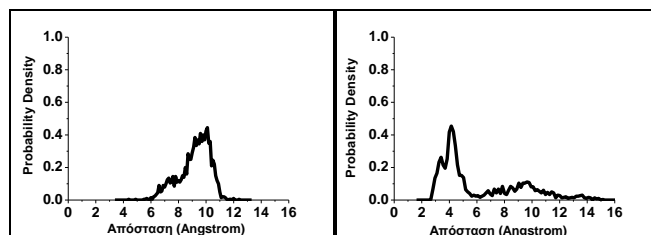


α)

β)

γ)

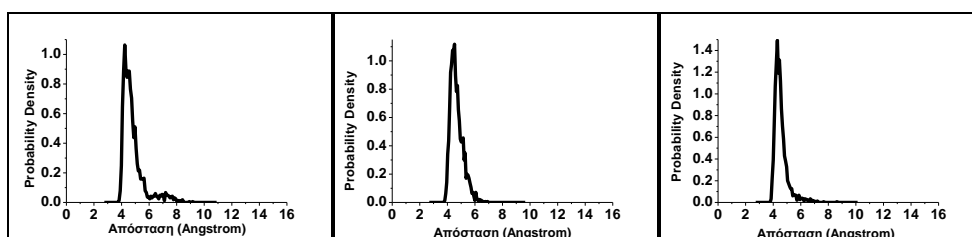
Σχ. 4.36 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 24 β) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης 45 και γ) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 48 για την περίπτωση Rme₂KmeSphos.



α)

β)

Σχ. 4.37 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της λυσίνης και της σερίνης και β) της αργινίνης με της σερίνης για την περίπτωση Rme₂Kme₃Sphos.

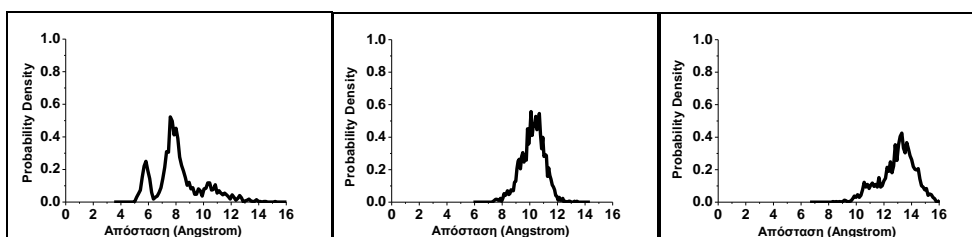


α)

β)

γ)

Σχ. 4.38 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 24 β) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης 45 και γ) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 48 για την περίπτωση Rme₂Kme₃Sphos.



α)

β)

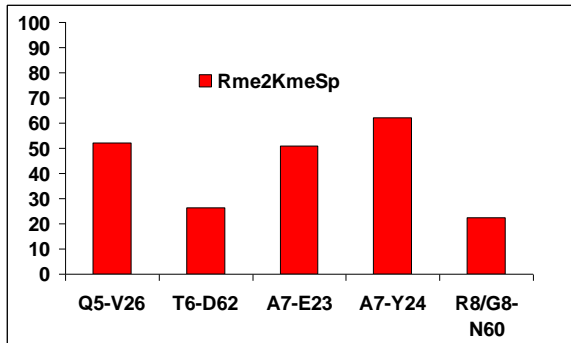
γ)

Σχ. 4.39 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 24 β) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης 45 και γ) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 48 για την περίπτωση Rme₂Kme₃Sphos.

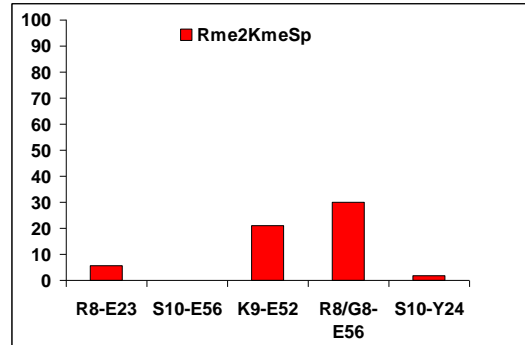
4.3.2.2 Δεσμοί υδρογόνου

Τέλος εξετάστηκαν οι δεσμοί υδρογόνου, τόσο αυτοί που βρέθηκαν κρυσταλλογραφικά όσο και αυτοί που δεν εντοπίζονται αρχικά (σχήματα 4.40 και 4.41). Στο σχήματα αυτό βλέπουμε μια έντονη σύνδεση της ιστόνης H3 με την HP1 όχι μόνο στην περιοχή της λυσίνης 9, αλλά και σε όλα τα αμινοξέα, που περιέχονται στην υπάρχουσα δομή της H3. Συγκεκριμένα βλέπουμε την γλουταμίνη 5 της H3 να σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την βαλίνη 26 της HP1 για ποσοστό χρόνου μεγαλύτερο του 50% και τη θρεονίνη 6 της H3 με το ασπαρτικό οξύ 62 της HP1 για ποσοστό περίπου 20%. Τα ποσοστά δεσμών υδρογόνου που σχηματίζουν η Αλανίνη 7 με την τυροσίνη 24 και το γλουταμικό οξύ 56 ξεπερνάνε και αυτά το 50%. Ακόμη το ποσοστό μεταξύ της αργινίνης 8 και του ασπαρτικού οξέος 60 ξεπερνάει το 20%. Επίσης διακρίνουμε και μια αλληλεπίδραση της αργινίνης 8 με το γλουταμικό οξύ 56 της HP1 σε ποσοστό της τάξεως του 30%, στην περίπτωση της μονομεθυλίωσης και 10% στην περίπτωση της τριμεθυλίωσης. Τέλος είναι εμφανής και η δημιουργία δεσμού υδρογόνου μεταξύ της λυσίνης 9 και του γλουταμικού οξέος 52 της HP1 σε ποσοστό κοντά στο 30% της τροχιάς στην περίπτωση της μονομεθυλίωσης της λυσίνης.

Από τα αποτελέσματα αυτά παρατηρούμε ότι οι δεσμοί υδρογόνου που είναι ορατοί στην κρυσταλλογραφική δομή εμφανίζονται και κατά την μοριακή δυναμική του συστήματος σε σημαντικά μάλιστα ποσοστά του χρόνου. Επίσης κατά την δυναμική είναι εφικτό να εντοπιστούν και κάποιοι άλλοι δεσμοί υδρογόνου που συμβάλλουν στην σύνδεση της HP1 με την H3. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ενός τέτοιου δεσμού είναι ο δεσμός μεταξύ του γλουταμικού οξέος 56 της HP1 και της αργινίνης 8 της H3, που πρόκειται για έναν δεσμό αξιοσημείωτης σταθερότητας που μάλιστα εμφανίζεται σε έντονα ποσοστά και στην περίπτωση που η αργινίνη 8 δεν είναι τροποποιημένη. Βέβαια στην περίπτωση, που διμεθυλιωθεί η αργινίνη 8, η ισχύς αυτού του δεσμού εξασθενεί. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα, ότι η σταθερότητα αυτού του δεσμού εξαρτάται από την τροποποίηση ή όχι της αργινίνης.

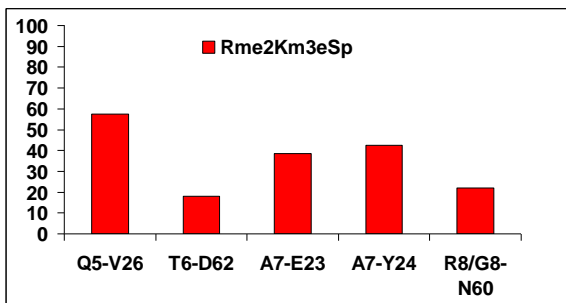


α)

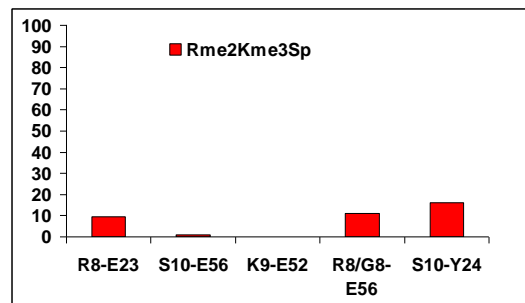


β)

Σχ. 4.40 Δεσμοί υδρογόνου που εντοπίστηκαν α) από τους Khorasanizadeh και Jacobs και β) κατά την εξέλιξη του συστήματος για την περίπτωση Rme₂KmeSphos.



α)



β)

Σχ. 4.41 Δεσμοί υδρογόνου που εντοπίστηκαν α) από τους Khorasanizadeh και Jacobs και β) κατά την εξέλιξη του συστήματος για την περίπτωση Rme₂Kme₃Sphos.

4.3.3 Τροποποιήσεις της λυσίνης 9 και σερίνης 10 και ταυτόχρονη μετάλλαξη της αργινίνης 8 σε γλυκίνη

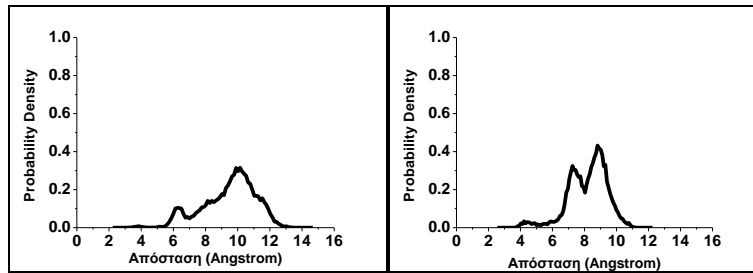
Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα η διμεθυλίωση της λυσίνης πραγματοποιήθηκε με κύριο σκοπό την αλλαγή στη κατανομή του θετικού φορτίου της αργινίνης. Από την τροποποίηση αυτή πετύχαμε την μείωση της ισχύος της αλληλεπίδρασης Coulomb μεταξύ της αργινίνης και της τροποποιημένης σερίνης. Παρόλα αυτά η αλληλεπίδραση εξακολουθεί να υφίσταται. Για την πλήρη απαλοιφή του θετικού φορτίου της H3 στη θέση του όγδοου καταλοίπου πραγματοποιήσαμε μετάλλαξη της αργινίνης 8 σε γλυκίνη, που δεν είναι φορτισμένη. Για την περίπτωση, που έχουμε την μετάλλαξη τα συστήματα που μελετήσαμε ήταν δύο. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η περίπτωση της μετάλλαξης με ταυτόχρονη μονομεθυλίωση της λυσίνης 8 και φωσφορυλίωση της σερίνης 10 και το δεύτερο σύστημα περιελάμβανε μετάλλαξη της αργινίνης σε γλυκίνη και ταυτόχρονη τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 και πάλι φωσφορυλίωση της σερίνης 10. Οι προσομοιώσεις πραγματοποιήθηκαν για συνολικό χρόνο 1μs.

4.3.3.1 Δομικά χαρακτηριστικά

Στα σχήματα 4.42 έως 4.47 βλέπουμε γραφικές παραστάσεις της απόστασης μεταξύ της λυσίνης 9 και της σερίνης 10, καθώς και της γλυκίνης 8 και της σερίνης 10 (αποστάσεις d1 και d3 στο σχ. 4.48). Η απόσταση d1 υπολογίστηκε μεταξύ του αζώτου Nη της λυσίνης 9 και του οξυγόνου Oγ της σερίνης 10, ενώ η d3 υπολογίστηκε μεταξύ του άνθρακα Ca της γλυκίνης 8 και του οξυγόνου Oγ της σερίνης 10. Επίσης υπολογίζουμε και την απόσταση μεταξύ των τριών αρωματικών δακτυλίων με την δεσμευμένη τροποποιημένη λυσίνη, αλλά και με την σερίνη που υπόκειται στην τροποποίηση.

Στα σχήματα αυτά παρατηρούμε την απόσταση μεταξύ της σερίνης και της λυσίνης να βρίσκεται ανάμεσα στα 6 και 13 Å με το μεγαλύτερο χρόνο η απόσταση μεταξύ αυτών των 2 αμινοξέων να βρίσκεται στα 10 Å και ένα πολύ μικρό χρονικό διάστημα η μεταξύ των αμινοξέων απόσταση να είναι στα 6.5 Å. Ακόμα η απόσταση μεταξύ της αργινίνης και της

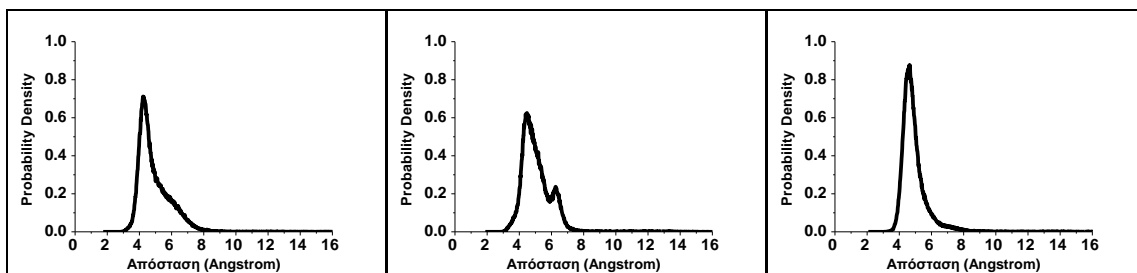
σερίνης είναι από 6 έως 11 Å παρουσιάζοντας 2 επικρατέστερες αποστάσεις στα 7 και στα 9 Å για το ίδιο σχεδόν χρονικό διάστημα. Επίσης διακρίνουμε την απόσταση μεταξύ της λυσίνης και των κέντρων των αρωματικών δακτυλίων που σχηματίζουν τον κλωβό των τριών αμινοξέων να είναι μεταξύ 4 και 8 Å. Σε συντριπτικό όμως ποσοστό η απόσταση αυτή βρίσκεται σε απόσταση 4.5 Å. Επίσης βλέπουμε και την απόσταση μεταξύ της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 24 να εμφανίζει μια τιμή γύρω στα 5 Å και μια δεύτερη που συναντάται και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα γύρω στα 10 Å, ενώ αυτή της σερίνης με την τρυπτοφάνη 45 να είναι μεταξύ 7 και 12 Å. Τέλος η απόσταση μεταξύ της σερίνης και της τυροσίνης 48 είναι μεταξύ 9 και 16 Å.



α)

β)

Σχ. 4.42 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της λυσίνης και της σερίνης και β) της γλυκίνης με την σερίνη για την περίπτωση GKmeSphos.

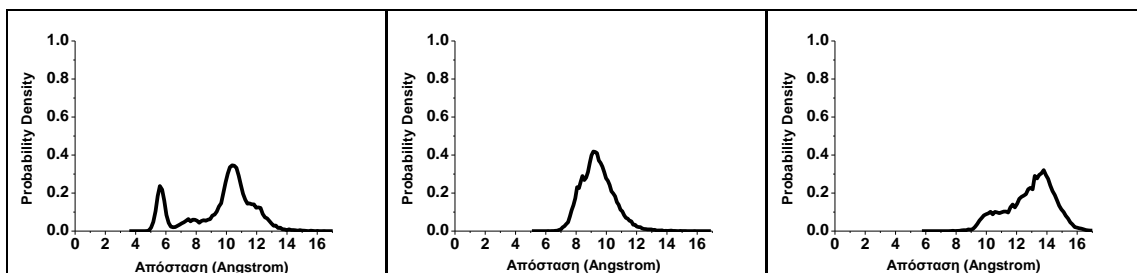


α)

β)

γ)

Σχ. 4.43 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 24 β) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης 45 και γ) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 48 για την περίπτωση GKmeSphos.

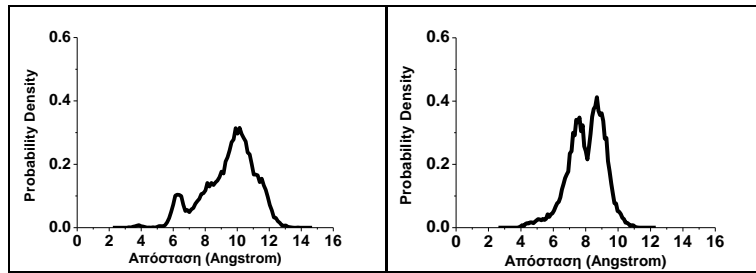


α)

β)

γ)

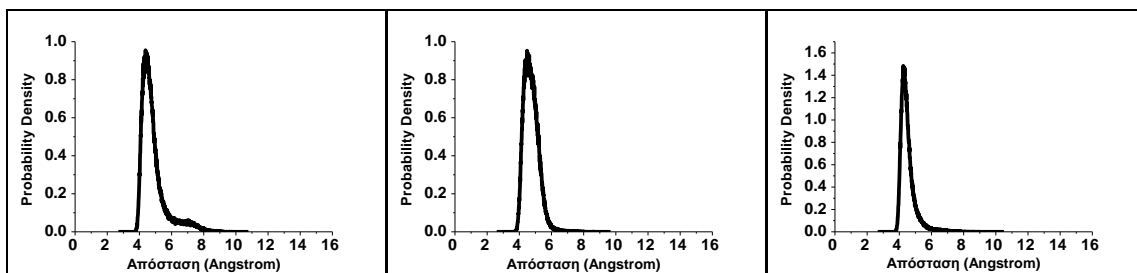
Σχ. 4.44 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 24 β) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης 45 και γ) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 48 για την περίπτωση GKmeSphos.



α)

β)

Σχ. 4.45 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της λυσίνης και της σερίνης και β) της γλυκίνης με την σερίνη για την περίπτωση GKme₃Sphos.

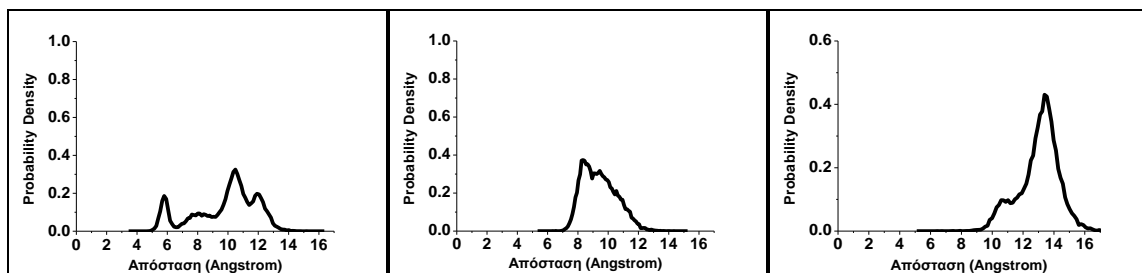


α)

β)

γ)

Σχ. 4.46 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 24 β) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης 45 και γ) της λυσίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 48 για την περίπτωση GKme₃Sphos.

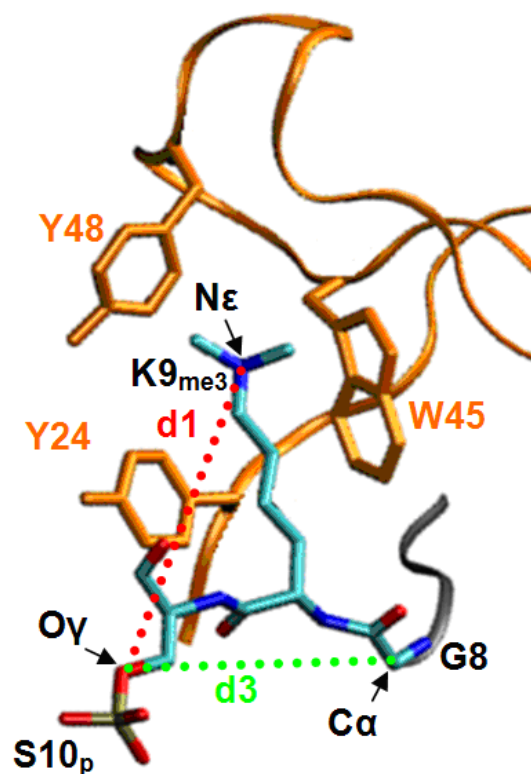


α)

β)

γ)

Σχ. 4.47 Τα διαγράμματα της απόστασης μεταξύ α) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 24 β) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης 45 και γ) της σερίνης και του κέντρου του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης 48 για την περίπτωση GKme₃Sphos.



Σχ. 4.48 Απεικόνιση της απόστασης μεταξύ της λυσίνης με την σερίνη (d1) και της αργινίνης με την γλυκίνη (d3).

Παρατηρώντας τα διαγράμματα 4.42-4.47 βλέπουμε ότι η γλυκίνη πλέον δεν αλληλεπιδρά με την σερίνη. Το αποτέλεσμα αυτό είναι έως ένα βαθμό αναμενόμενο διότι πλέον το νέο αμινοξύ αφ' ενός έχει μικρότερο όγκο από την αργινίνη με αποτέλεσμα να είναι πιο απομακρυσμένο από την σερίνη και κατά δεύτερο λόγο και σημαντικότερο είναι ότι το αμινοξύ της γλυκίνης δεν είναι φορτισμένο με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατόν να αναπτυχθεί αλληλεπίδραση τύπου Coulomb. Ακόμη από τον υπολογισμό της απόστασης και κατ' επέκταση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της αρνητικά φορτισμένης φωσφορυλιομάδας της σερίνης με την θετικά φορτισμένη τροποποιημένη λυσίνη αναμέναμε αρχικά να υπήρχε μια έντονη αλληλεπίδραση πράγμα που δεν παρατηρήθηκε, αφού απουσιάζει η αργινίνη. Το αποτέλεσμα αυτό αν το δούμε σε αντιδιαστολή με την έντονη δέσμευση της τροποποιημένης λυσίνης από τον κλωβό μας ωθεί στο συμπέρασμα ότι ο κλωβός των 3 αμινοξέων διαθέτει μια πάρα πολύ ισχυρή δέσμευση με την λυσίνη που δεν είναι ικανή να σπάσει μόνο με την βοήθεια αλληλεπιδράσεων Coulomb από γειτονικά

κατάλοιπα και για την αποδέσμευση της H3 από την HP1 απαιτείται πιθανώς κάποιος μηχανισμός περισσοτέρων σταδίων.

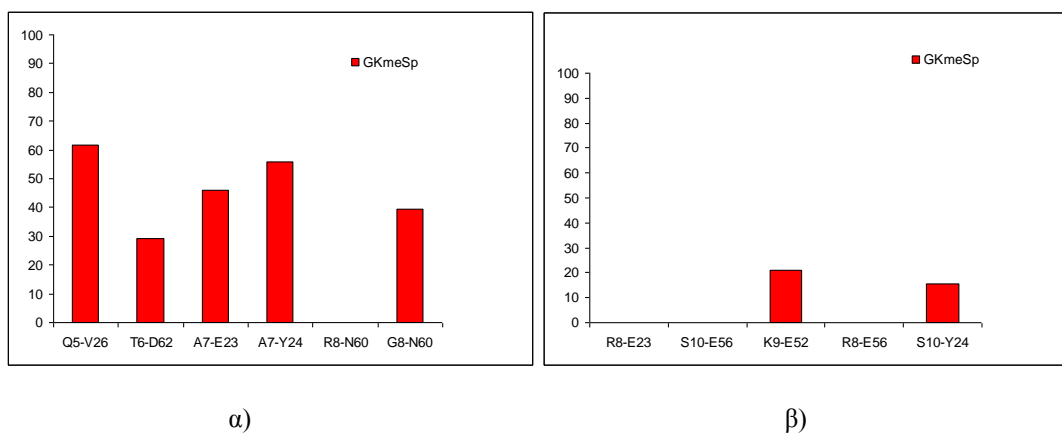
4.3.3.2 Δεσμοί υδρογόνου

Και σε αυτή την περίπτωση έγινε υπολογισμός των δεσμών υδρογόνου χρησιμοποιώντας τα κριτήρια που είχαμε στις προηγούμενες ενότητες. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στα σχήματα 4.49 και 4.50.

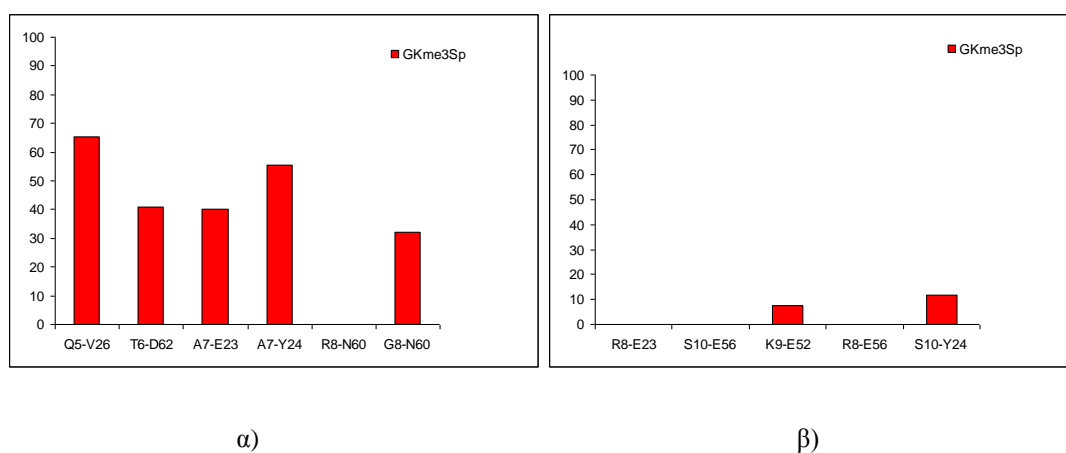
Στα σχήματα αυτά βλέπουμε την γλουταμίνη 5 της H3 να σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την βαλίνη 26 της HP1 για ποσοστό χρόνου μεγαλύτερο του 60%, την θρεονίνη 6 της H3 με το ασπαρτικό οξύ 62 της HP1 να σχηματίζει δεσμό υδρογόνου για 30% περίπου του χρόνου στις περιπτώσεις της μετάλλαξης με μονομεθυλίωση της λυσίνης σκι γύρω στα 40% στην περίπτωση της τρι-μεθυλίωσης. Ακόμη η αλανίνη 7 της H3 σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το γλουταμικό οξύ 23 και την τυροσίνη 24 της HP1 σε ποσοστά πλησίον του 50% και του 60% αντίστοιχα. Επίσης βλέπουμε ότι η γλυκίνη 8 με την ασπαραγίνη 60 σχηματίζουν δεσμό υδρογόνου για 40% περίπου του χρόνου στις περιπτώσεις της μετάλλαξης με μονομεθυλίωση της λυσίνης και γύρω στα 30% στην περίπτωση της τρι-μεθυλίωσης. Οι δεσμοί αυτοί εντοπίστηκαν κρυσταλλογραφικά από τους Khorasanizadeh και Jacobs. Κατά την μοριακή δυναμική του συστήματος εντοπίστηκαν και οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της λυσίνης 9 και του γλουταμικού οξέος 52 για περίπου το 20% της τροχιάς στην περίπτωση της μονομεθυλίωσης της λυσίνης και γύρω στο 10% στην περίπτωση της τριμεθυλίωσης. Ακόμα παρατηρούμε και δεσμό υδρογόνου μεταξύ της σερίνης 10 και της τυροσίνης 24 για τα ίδια περίπου ποσοστά με τον προηγούμενο δεσμό.

Παρατηρώντας αυτά τα σχήματα σε συνδυασμό με τα αντίστοιχα σχήματα των προηγούμενων περιπτώσεων βλέπουμε ότι οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζουν μεγαλύτερη σταθερότητα και εμφανίζονται σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα της τροχιάς. Το γεγονός αυτό ενισχύει την σημασία που έχει η ελλείπουσα σε αυτήν την περίπτωση αλληλεπίδραση R-S. Κάτι που είναι εμφανές και στην σύγκριση των δεσμών της αργινίνης 8 με την

ασπαραγίνη 60 και της γλυκίνης 8 με το ίδιο αμινοξύ, όπου βλέπουμε ο δεσμός στην δεύτερη περίπτωση να είναι αισθητά ανθεκτικότερος.



Σχ. 4.49 Δεσμοί υδρογόνου που εντοπίστηκαν α) από τους Khorasanizadeh και Jacobs και β) κατά την εξέλιξη του συστήματος για την περίπτωση GKmeSphos.



Σχ. 4.50 Δεσμοί υδρογόνου που εντοπίστηκαν α) από τους Khorasanizadeh και Jacobs και β) κατά την εξέλιξη του συστήματος για την περίπτωση GKme₃Sphos.

5. Το σύστημα H₃-H₃

5.1 Εισαγωγή

Έχει βρεθεί ότι οι απλοί κανόνες που ισχύουν καλά για την περίπτωση που πραγματοποιείται μεθυλίωση ή ακετυλίωση της ιστόνης δεν φαίνονται να επαληθεύονται για την περίπτωση που έχουμε φωσφορυλίωση των ιστονών, μια τροποποίηση που εμφανίζεται σε φαινομενικά ανόμοιες καταστάσεις. Ως παράδειγμα μπορεί να αναφερθεί ότι η φωσφορυλίωση της H3 πραγματοποιείται όταν υποκινούνται τα κύτταρα σε μεσοφάση από τους παράγοντες αύξησης και μπαίνουν σε μια μεταγραφικά υπερενεργή κατάσταση, αλλά το ίδιο συμβαίνει και κατά την διάρκεια της μίτωσης όταν συμπυκνώνεται η χρωματίνη και αδρανοποιείται η μεταγραφική δραστηριότητα [128]. Επιπλέον η φωσφορυλίωση της H2A.X εμφανίζεται συνήθως μετά από καταστροφή του DNA [129], αλλά το ίδιο παρατηρείται επίσης κάτω από φυσιολογικά μοναδικές συνθήκες, π.χ. υποκίνηση των ιονοτροπικών υποδοχέων γλουταμικού στους νευρώνες [130]. Η ιστόνη που φωσφορυλιώνεται περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη είναι η ιστόνη H3 [131]. Οι χαρακτηριστικές τροποποιήσεις της H3 είναι οι φωσφορυλιώσεις της θρεονίνης 3,11, της σερίνης 10 και της σερίνης 28 καθώς και οι μεθυλιώσεις της λυσίνης 4,9 και 27, όπως επίσης και της αργινίνης 2 και 8 [132-137]. Για παράδειγμα δεν είναι σαφές εάν η φωσφορυλίωση σε ένα ιδιαίτερο κατάλοιπο σερίνης ή θρεονίνης μιας περιοχής μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα «σημειακό σήμα» ή ένα μέρος μιας πιο σύνθετης ανάγνωσης που περιλαμβάνει τις παρακείμενες τροποποιήσεις. Επιπλέον δεν είναι γνωστό αν η φωσφορυλίωση της θρεονίνης ή της σερίνης δημιουργεί νέες περιοχές συνδέσεων για τις πρωτεΐνες που συνδέονται στη χρωματίνη ή εάν έχει επίπτωση στην άμεση αναδίπλωση της χρωματίνης.

Είναι γνωστό σήμερα ότι περιοχές μεταγραφικά ανενεργής συστατικής χρωματίνης είναι εμπλουτισμένες σε πλήθος τροποποιημένων και συγκεκριμένα μεθυλιωμένων αμινοξέων. Για την ακρίβεια οι τροποποιήσεις που συναντάμε είναι H3K9me3, H3K27me1 και H4K20me3, ενώ η θεμελιώδης ετεροχρωματίνη περιέχει H3K9me2, H3K27me3, H4K9me1, H3K9me3, H3K27me1 και H4K20me3.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η ιστόνη H3 είναι περιοδικά φωσφορυλιωμένη στην θέση της θρεονίνης 3 κατά την διάρκεια της μίτωσης και καταλύεται από την κινάσα

haspin. Έχει βρεθεί ότι ο συνδυασμός τροποποιήσεων της ιστόνης H3 με τις τροποποιήσεις της φωσφορυλίωσης της θρεονίνης 3, της τριμεθυλίωσης της λυσίνης 4 και της διμεθυλίωσης της αργινίνης 8 παίζει ρόλο κατά την διαδικασία της μίτωσης [138].

Στην παρούσα μελέτη θα ερευνηθεί η επίπτωση που θα έχουν οι διάφορες τροποποιήσεις συμπεριλαμβανομένων της φωσφορυλίωσης της θρεονίνης 3 και της σερίνης 10 σε συνδυασμό με άλλες τροποποιήσεις στο βαθμό που αυτές αλληλεπιδρούν. Το προς μελέτη σύστημα περιλαμβάνει μικρό αριθμό καταλοίπων από δυο αλληλεπιδρώντες ιστονικές ουρές H3 που βρίσκονται γειτονικά η μία στην άλλη.

Με τον τρόπο αυτό θα επιχειρηθεί να δοθεί, μελετώντας δομικές ιδιότητες, κάποια απάντηση για τον τρόπο που συμπεριφέρεται η ιστόνη H3 όταν υποστεί διάφορες τροποποιήσεις.

5.2 Το σύστημα H3-H3

Τα συστήματα που μελετήθηκαν περιλαμβάνουν την αλληλεπίδραση μεταξύ δυο ουρών της ιστόνης H3, που βρίσκονται γειτονικά ή μια με την άλλη. Πιο συγκεκριμένα τα συστήματα που μελετήθηκαν είναι:

- Ατροποιοίητες και οι δυο ιστονικές ουρές της H3
- Τροποποιημένη η μία από τις δυο ιστονικές ουρές στις θέσεις που μπορεί να υποστεί τροποποίηση. Αναλυτικότερα οι τροποποιήσεις που πραγματοποιήσαμε είναι: ασύμμετρη διμεθυλίωση της αργινίνης 2, φωσφορυλίωση της θρεονίνης 3, τριμεθυλίωση της λυσίνης 4, ασύμμετρη διμεθυλίωση της αργινίνης 8, τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 και φωσφορυλίωση της σερίνης 10.
- Τροποποιημένες και οι δύο ιστονικές ουρές με τις τροποποιήσεις που αναφέρονται στην δεύτερη περίπτωση.

Ο συνολικός αριθμός των αμινοξέων που περιελάμβανε το προς μελέτη σύστημα είναι 22, δηλαδή 11 αμινοξέα για κάθε μία από τις 2 ιστονικές ουρές της H3. Και για τις δύο ιστόνες

χρησιμοποιήθηκε η ίδια αλληλουχία αμινοξέων ξεκινώντας από το δεύτερο αμινοξύ που είναι αργινίνη. Οι ιστόνες H3 τερματίζονται στα 2 άκρα τους με ακετυλο-μεθυλομάδα (ACE) και N-μέθυλομάδα (NME).

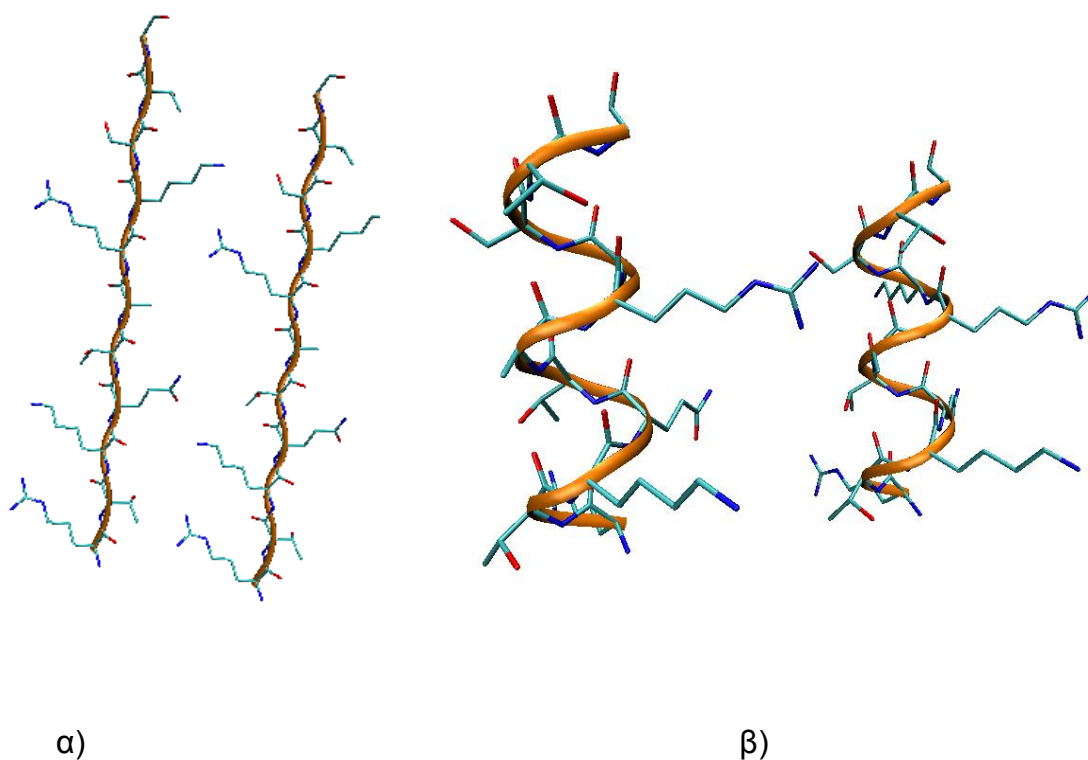
Ακόμη πραγματοποιήθηκε και μελέτη τριών ακόμα συστημάτων της H3 που περιελάμβαναν στην μία άκρη τους αντί για τερματική ακετυλο-ομάδα μια τερματική αλανίνη που αποτελεί και το πρώτο αμινοξύ της ιστονικής ουράς. Για τα νέα πλέον συστήματα πραγματοποιήθηκαν άλλες τρεις περιπτώσεις τροποποιήσεων. Συγκεκριμένα οι περιπτώσεις που μελετήθηκαν είναι:

- Ατροποποίητες και οι δύο ιστονικές ουρές της H3
- Μερικώς τροποποιημένη η μία από της δύο ιστονικές ουρές. Αναλυτικότερα οι τροποποιήσεις που πραγματοποιήσαμε είναι: Φωσφορυλίωση της θρεονίνης 3, τριμεθυλίωση της λυσίνης 4, ασύμμετρη διμεθυλίωση της αργινίνης 8.
- Τροποποιημένες και οι δύο ιστονικές ουρές με τις τροποποιήσεις που αναφέρονται στην προηγούμενη περίπτωση.

Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν δύο αρχικές διαμορφώσεις για τις ιστόνες. Η μία περιλάμβανε εκτεταμένη διαμόρφωση και η δεύτερη ελικοειδή (σχήμα 5.1). Ο συνολικός αριθμός των συστημάτων που μελετήθηκαν επομένως ανέρχεται στα 12. Συγκεντρωτικά όλες οι περιπτώσεις φαίνονται στον πίνακα 5.1.

	Περιπτώσεις	Ονομασία
Με τερματισμένες Ακέτυλο- και N-μέθυλο- ομάδες	Ατροποποίητες οι 2 ιστονικές ουρές στη α διαμόρφωση	H3-H3-α
	Πλήρως τροποποιημένη η 1 από τις 2 στην α διαμόρφωση	H3mod-H3-α
	Πλήρως Τροποποιημένες και οι 2 ιστονικές ουρές στην α διαμόρφωση	H3mod-H3mod-α
	Ατροποποίητες οι 2 ιστονικές ουρές στη β διαμόρφωση	H3-H3-β
	Πλήρως τροποποιημένη η 1 από τις 2 στην β διαμόρφωση	H3mod-H3-β
	Πλήρως Τροποποιημένες και οι 2 ιστονικές ουρές στην β διαμόρφωση	H3mod-H3mod-β
Με τερματισμένες Αλανίνη και N- μέθυλο- ομάδες	Ατροποποίητες οι 2 ιστονικές ουρές στη α διαμόρφωση	H3n-H3n-α
	Μερικώς τροποποιημένη η 1 από τις 2 στην α διαμόρφωση	H3n-mod-H3n-α
	Μερικώς Τροποποιημένες και οι 2 ιστονικές ουρές στην α διαμόρφωση	H3n-mod-H3n-mod-α
	Ατροποποίητες οι 2 ιστονικές ουρές στη β διαμόρφωση	H3n-H3n-β
	Μερικώς τροποποιημένη η 1 από τις 2 στην β διαμόρφωση	H3n-mod-H3n-β
	Μερικώς Τροποποιημένες και οι 2 ιστονικές ουρές στην β διαμόρφωση	H3n-mod-H3n-mod-β

Πίνακας 5.1 Οι περιπτώσεις που μελετήθηκαν.



Σχ.5.1 Απεικόνιση των δυο διαμορφώσεων του συστήματος H3-H3. Στο α) είναι η εκτεταμένη διαμόρφωση και στο β) η ελικοειδής διαμόρφωση.

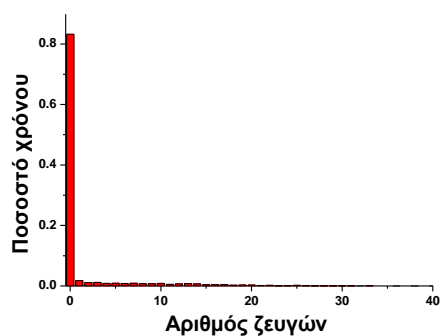
5.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

Για την πραγματοποίηση ελαχιστοποίησης και μοριακής δυναμικής των δώδεκα συστημάτων έγιναν τα παρακάτω βήματα. Αρχικά πραγματοποιήθηκε κατάλληλος τερματισμός με ACE και NME όπως αναφέρεται στην προηγούμενη ενότητα. Στην συνέχεια, όπου απαιτείται, έγινε προσθήκη ιόντων χλωρίου ή νατρίου προκειμένου το σύστημα να γίνει ουδέτερο. Κατόπιν προστέθηκε άλας χλωριούχου νατρίου σε συγκέντρωση 0.2 M, ενώ ολόκληρο το σύστημα εμπλουτίζεται με ρητή παρουσία μορίων νερού τύπου TIP3P έως αποστάσεων 20 Å από τα άκρα του πεπτιδίου.

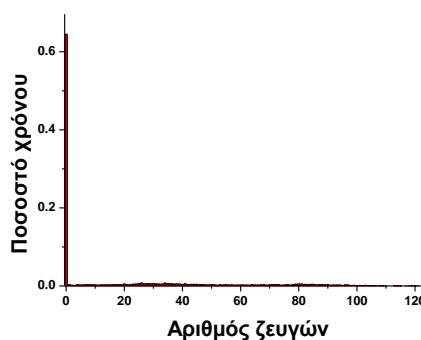
Σε καθένα από τα μοντέλα που κατασκευάστηκαν αρχικά έγινε ελαχιστοποίηση δυο σταδίων. Κατά το πρώτο στάδιο η ελαχιστοποίηση γίνεται ως προς τις θέσεις των μορίων του διαλύτη, ενώ τα μόρια της διαλυμένης ουσίας διατηρούνται σταθερά. Κατά το δεύτερο

στάδιο γίνεται ελαχιστοποίηση ολόκληρου του συστήματος. Στη συνέχεια πραγματοποιείται αργή θέρμανση του συστήματος έως την επιθυμητή θερμοκρασία των 37 °C. Ακολουθεί μικρός αριθμός βημάτων μοριακής δυναμικής στο μικροκανονικό σύστημα και τέλος πραγματοποιείται μοριακή δυναμική στο ισόθερμο-ισοβαρές σύστημα στο οποίο γίνεται και η καταγραφή των αποτελεσμάτων. Όλες οι προσομοιώσεις που πραγματοποιήθηκαν στο στάδιο της συλλογής των αποτελεσμάτων έγιναν για χρονικό διάστημα 200 ns.

Στα σχήματα 5.2-5-7 φαίνονται γραφήματα που δείχνουν τον πλήθος των ζευγών από άτομα μεταξύ των δυο ιστονικών ουρών στα οποία η μεταξύ τους απόσταση είναι μικρότερη από 3 Å, σε συνάρτηση με το ποσοστό του χρόνου που συμβαίνει αυτό.

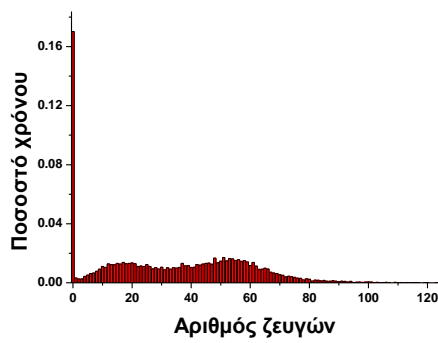


α)

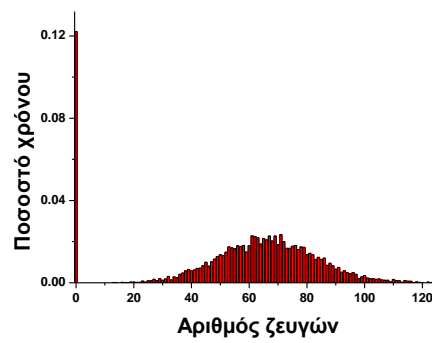


β)

Σχ. 5.2 Απεικόνιση του αριθμού των ζευγών που ικανοποιούν την συνθήκη απόστασης μικρότερη των 3 Å για την περίπτωση των ατροποποίητων ιστονών (H3-H3) στην α) ελικοειδή και β) εκτεταμένη διαμόρφωση.

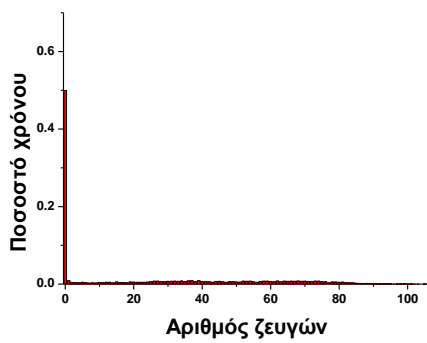


α)

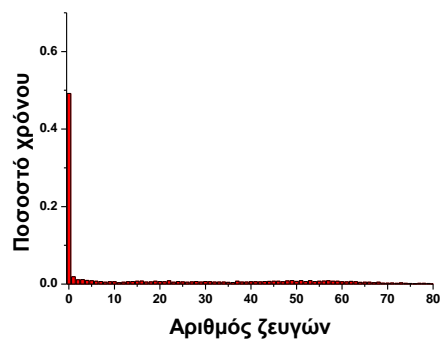


β)

Σχ. 5.3 Απεικόνιση του αριθμού των ζευγών που ικανοποιούν την συνθήκη απόστασης μικρότερη των 3 Å για την περίπτωση της πλήρως τροποποιημένης με ατροποποίητη ιστόνη (H3mod-H3) στην α) ελικοειδή και β) εκτεταμένη διαμόρφωση.

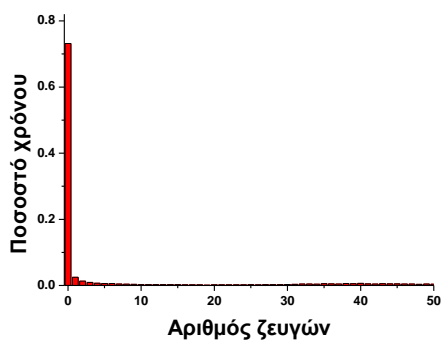


α)

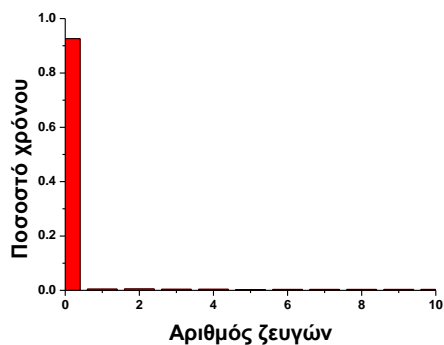


β)

Σχ. 5.4 Απεικόνιση του αριθμού των ζευγών που ικανοποιούν την συνθήκη απόστασης μικρότερη των 3 Å για την περίπτωση της πλήρως τροποποιημένης με πλήρως τροποποιημένη ιστόνη (H3mod-H3mod) στην α) ελικοειδή και β) εκτεταμένη διαμόρφωση.

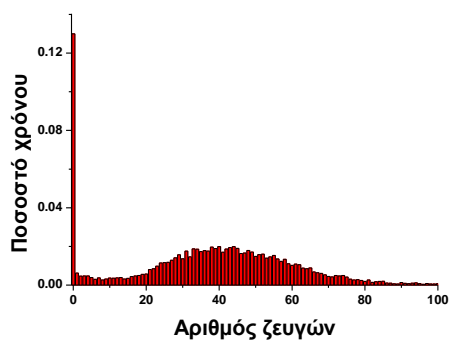


α)

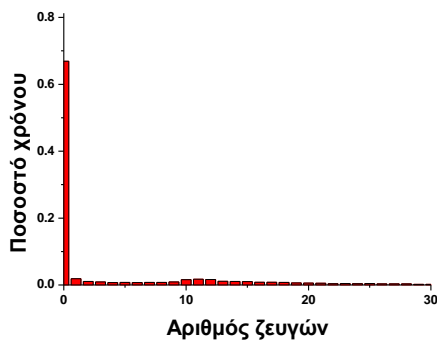


β)

Σχ. 5.5 Απεικόνιση του αριθμού των ζευγών που ικανοποιούν την συνθήκη απόστασης μικρότερη των 3 Å για την περίπτωση των ατροποποίητων ιστονών με τερματικό από την μία πλευρά αμινοξύ αλανίνης (H3n-H3n) στην α) ελικοειδή και β) εκτεταμένη διαμόρφωση.

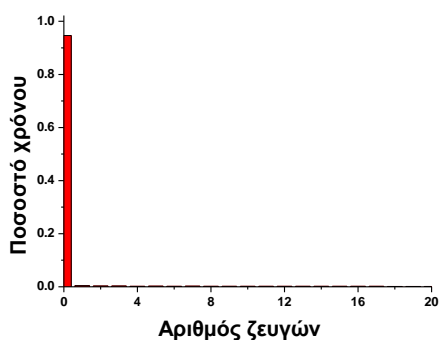


α)

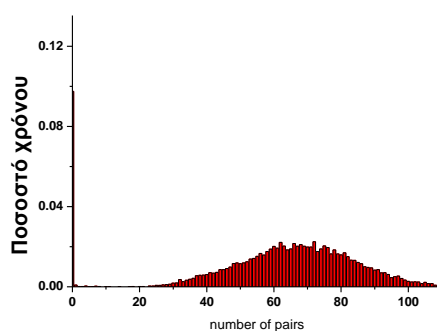


β)

Σχ. 5.6 Απεικόνιση του αριθμού των ζευγών που ικανοποιούν την συνθήκη απόστασης μικρότερη των 3 Å για την περίπτωση της μερικώς τροποποιημένης με ατροποποίητη ιστόνη (H3n-mod-H3n) στην α) ελικοειδή και β) εκτεταμένη διαμόρφωση.



α)

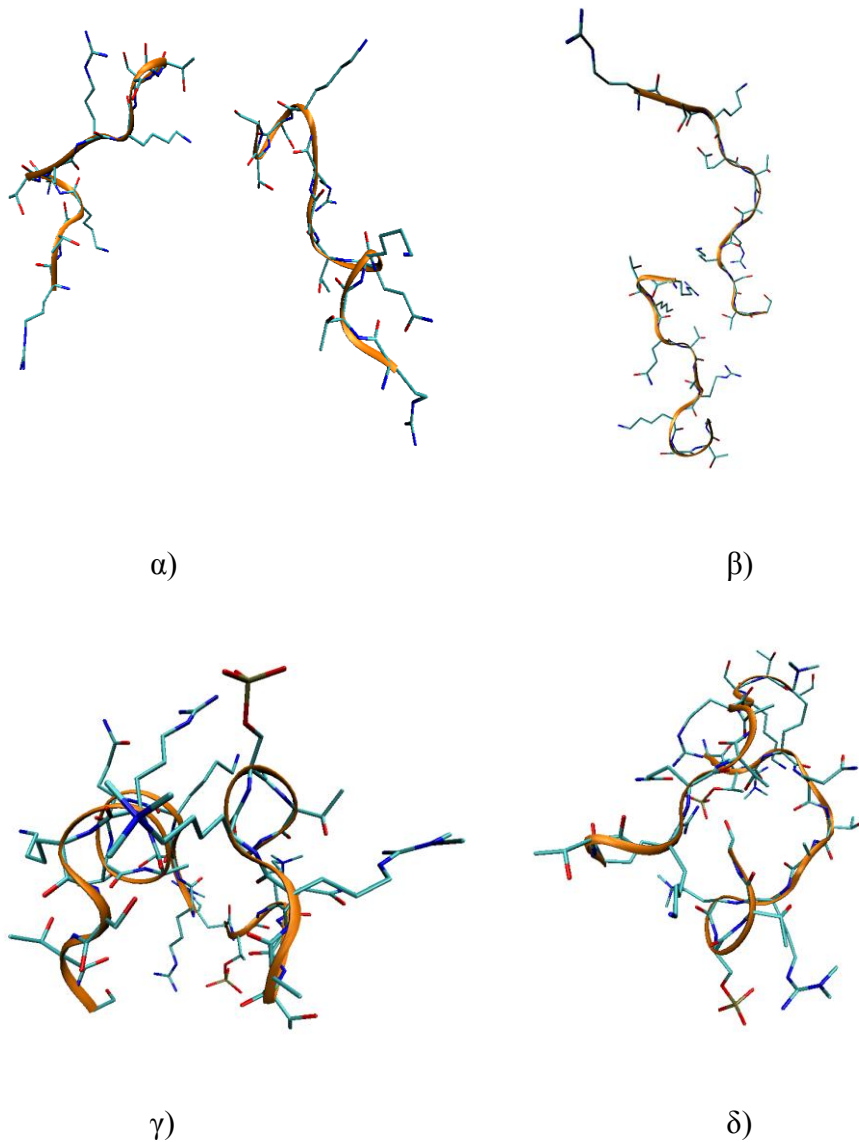


β)

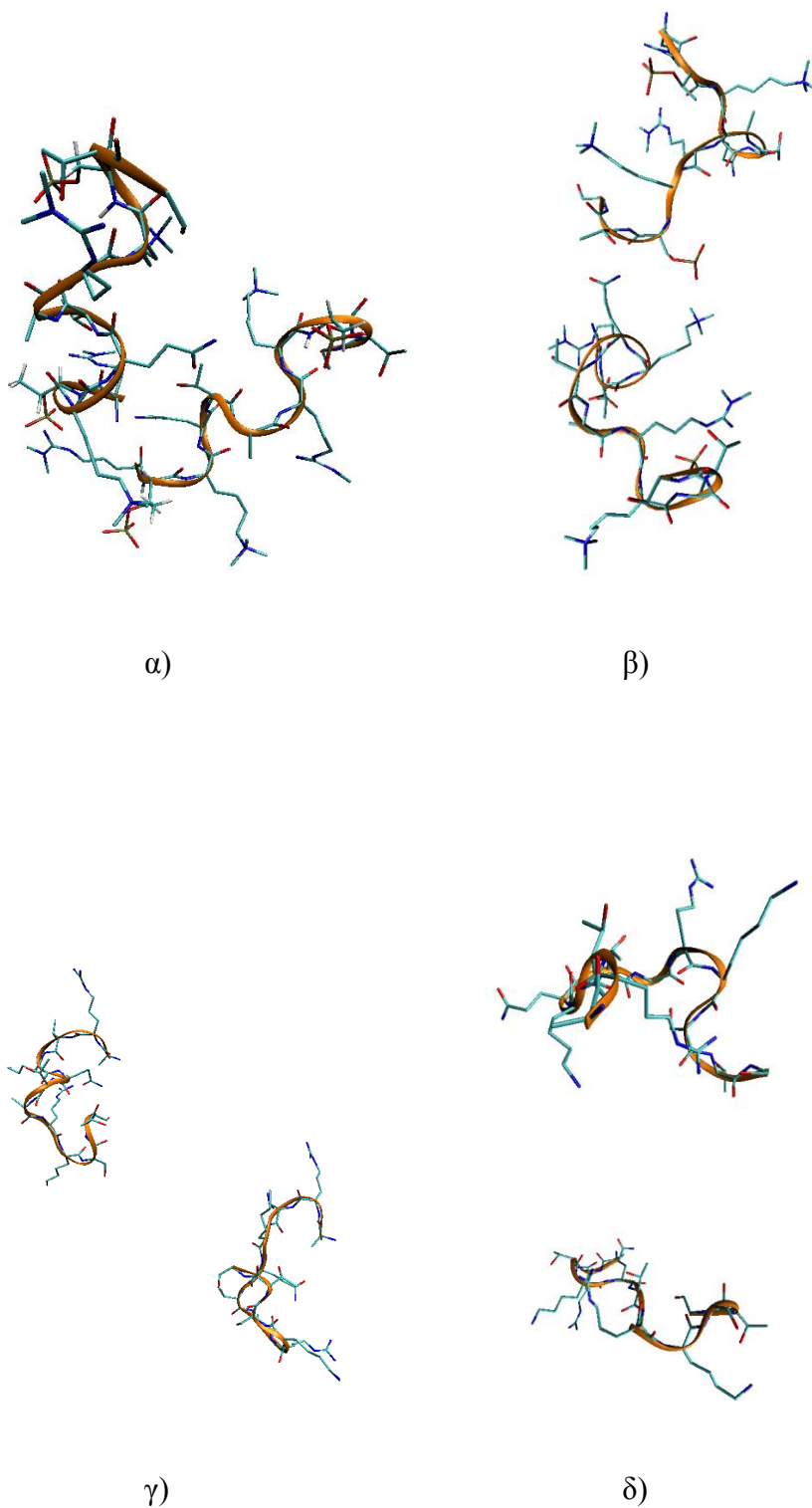
Σχ. 5.7 Απεικόνιση του αριθμού των ζευγών που ικανοποιούν την συνθήκη απόστασης μικρότερη των 3 Å για την περίπτωση της μερικώς τροποποιημένης με μερικώς τροποποιημένη ιστόνη (H3n-mod-H3n-mod) στην α) ελικοειδή και β) εκτεταμένη διαμόρφωση.

Από την ανάλυση των παραπάνω γραφημάτων είμαστε σε θέση να διακρίνουμε ότι στην περίπτωση που δεν υπάρχει τροποποίηση σε κάποιο από τα αμινοξέα που αποτελούν είτε την μία είτε την άλλη ιστονική ουρά δεν υφίσταται καμία αλληλεπίδραση αυτών, ενώ στην περίπτωση που πραγματοποιείται είτε πλήρης είτε μερική τροποποίηση σε μία από τις δυο ιστόνες το αποτέλεσμα αυτό διαφοροποιείται και εμφανίζεται μια έντονη αλληλεπίδραση των 2 ιστονικών ουρών. Μάλιστα η αλληλεπίδραση αυτή εμφανίζεται με δημιουργία πέραν του ενός σημείων σύνδεσης μεταξύ των 2 ιστονών. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των 2 ιστονών ευνοεί τα νουκλεοσώματα να έρθουν πιο κοντά το ένα στο άλλο και κατ' επέκταση στην συμπίκνωση της χρωματίνης, ένα αποτέλεσμα μάλιστα που επιβεβαιώθηκε και πειραματικά [138].

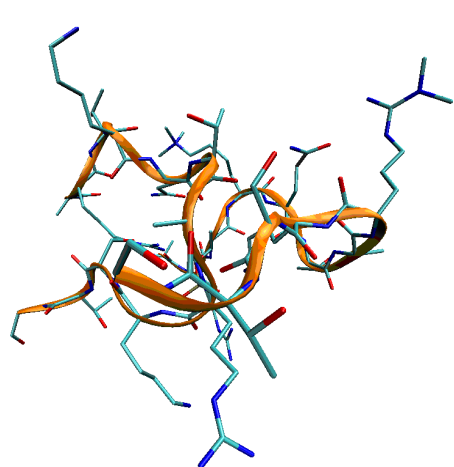
Στα σχήματα 5.8 και 5.10 φαίνεται ένα χαρακτηριστικό στιγμιότυπο που καταγράφηκε σε κάθε μία από τις προαναφερθείσες τροχιές και διακρίνεται η συμπεριφορά που αναφέρθηκε παραπάνω.



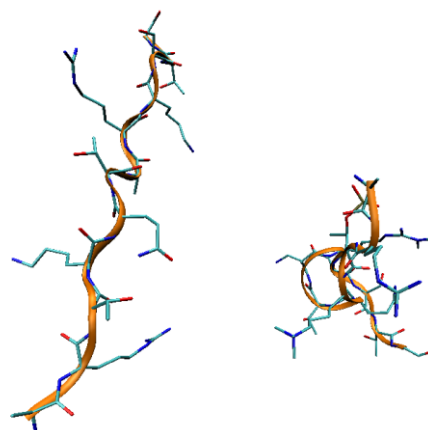
Σχ. 5.8 Χαρακτηριστικά στιγμιότυπα από την μοριακή δυναμική στις περιπτώσεις α) ατροποποίητων και των δυο ιστονών στην ελικοειδή διαμόρφωση, β) ατροποποίητων και των δυο ιστονών στην εκτεταμένη διαμόρφωση, γ) πλήρως τροποποιημένη η μία από τις δυο ιστόνες στην ελικοειδή διαμόρφωση και δ) τροποποιημένη η μία από τις δυο ιστόνες στην εκτεταμένη διαμόρφωση.



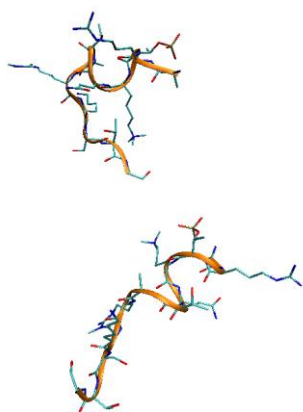
Σχ. 5.9 Χαρακτηριστικά στιγμιότυπα από την μοριακή δυναμική στις περιπτώσεις α) πλήρως τροποποιημένες και οι δυο ιστόνες στην ελικοειδή διαμόρφωση, β) πλήρως τροποποιημένες και οι δυο ιστόνες στην εκτεταμένη διαμόρφωση, γ) ατροποποίητων και των δυο ιστονών στην ελικοειδή διαμόρφωση στην περίπτωση που χρησιμοποιείται ως τερματικό μόριο αλανίνης, και δ) ατροποποίητων και των δυο ιστονών στην εκτεταμένη διαμόρφωση στην περίπτωση που χρησιμοποιείται ως τερματικό μόριο αλανίνης,



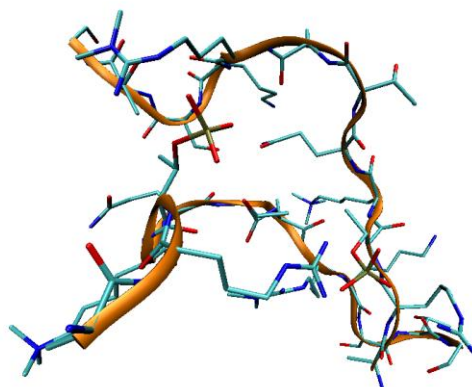
α)



β)



γ)



δ)

Σχ. 5.10 Χαρακτηριστικά στιγμιότυπα από την μοριακή δυναμική στις περιπτώσεις α) μερικώς τροποποιημένη η μία από τις δυο ιστόνες στην ελικοειδή διαμόρφωση, β) μερικώς τροποποιημένη η μια από τις δυο ιστόνες στην εκτεταμένη διαμόρφωση, γ) μερικώς τροποποιημένες και οι δυο ιστόνες στην ελικοειδή διαμόρφωση και δ) μερικώς τροποποιημένες και οι δυο ιστόνες στην εκτεταμένη διαμόρφωση.

6. Συμπεράσματα

Είναι γνωστό ότι οι τροποποιήσεις πρωτεϊνών παρουσιάζουν μεγάλη βιολογική σημασία. Έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν τα επιγενετικά κληρονομούμενα χαρακτηριστικά, αλλά και σε πολλές περιπτώσεις είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση διάφορων ασθενειών. Προκειμένου να γίνει η μελέτη συστημάτων που να περιέχουν τροποποιημένα αμινοξέα στην παρούσα διδακτορική διατριβή αρχικά κατασκευάστηκε ένα συνεπές σύνολο παραμέτρων, για χρήση με τα σύνολα parm94/parm99 του δυναμικού amber99.

Οι παράμετροι που κατασκευάσαμε αποδίδουν ικανοποιητικά στην δυναμική και δομική μελέτη των εν λόγω αμινοξέων και μάλιστα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μελέτη μεγαλύτερων δομικών μονάδων, που ήταν και ο αντικειμενικός σκοπός για των οποίου κατασκευάστηκαν.

Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε μελέτη διάφορων συστημάτων που περιείχαν μερικές από αυτές τις τροποποιήσεις. Τα πρώτα συστήματα που μελετήθηκαν περιελάμβαναν διάφορες τροποποιήσεις της αργινίνης 8, της λυσίνης 9 και της σερίνης 10 της ιστόνης H3 στο σύστημα της HP1 με την H3, καθώς και μετάλλαξη της αργινίνης 8 σε γλυκίνη 8. Η προσομοίωση κάθε συστήματος έγινε για χρόνο 1 μ s. Παρατηρήσαμε ότι η φωσφορυλίωση είτε αυτή πραγματοποιείται ως μοναδική τροποποίηση στις ήδη τροποποιημένες δομές της λυσίνης, είτε πραγματοποιείται σε συνδυασμό με διμεθυλίωση ή μετάλλαξη της αργινίνης 8 δεν είναι ικανή από μόνη της να προκαλέσει την αποκόλληση της ιστόνης H3 από την πρωτεΐνη HP1. Επομένως πειραματικές αναφορές που κάνουν λόγο για τέτοιου είδους αλλαγές στη δομή βασίζονται σε μηχανισμό περισσοτέρων του ενός σταδίου. Ακόμη βλέπουμε την δημιουργία μιας πάρα πολύ έντονης αλληλεπίδρασης μεταξύ της σερίνης και της αργινίνης όταν πραγματοποιείται φωσφορυλίωση της πρώτης. Η αλληλεπίδραση αυτή όταν η αργινίνη αντικατασταθεί από την γλυκίνη παύει να υφίσταται. Το αποτέλεσμα αυτό αναφέρεται για πρώτη φορά για την περίπτωση του συστήματος HP1-H3. Βέβαια η σημασία της αλληλεπίδρασης αυτής είναι κάτι που έχει μελετηθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία [139] αλλά δεν υπάρχουν αναφορές για το συγκεκριμένο σύστημα. Η αλληλεπίδραση αυτή μάλιστα έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία μιας πάρα πολύ σταθερής δομής σε σχήμα Π μεταξύ αυτών των τριών αμινοξέων (αργινίνη-λυσίνη-σερίνη) για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα της προσομοίωσης. Ακόμη διακρίνουμε και τον έντονα

ανταγωνιστικό ρόλο που παίζει το γλουταμικό οξύ 56 της πρωτεΐνης HP1. Πιο συγκεκριμένα το γλουταμικό οξύ δείχνει μια προτίμηση να σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την αργινίνη 8 όταν η σερίνη είναι φωσφορυλιωμένη, ενώ σε αντίθετη περίπτωση σχηματίζει δεσμό με την σερίνη. Αξίζει να αναφερθεί ακόμα ότι στην περίπτωση που πραγματοποιείται ταυτόχρονα με την φωσφορυλίωση της σερίνης και μετάλλαξη της αργινίνης σε γλυκίνη, το γλουταμικό οξύ δεν σχηματίζει δεσμό υδρογόνου. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινοξέων αργινίνη 8, σερίνη 10 και γλουταμικού οξέος 56 προκαλούν αστάθεια στη σύνδεση της HP1 με την H3 και το αποτέλεσμα αυτό εκφράζεται με την δημιουργία δεσμών υδρογόνου.

Ακόμη μελετήθηκαν και συστήματα που περιελάμβαναν αλληλεπίδραση μεταξύ 2 μικρού μήκους ιστονικών ουρών H3 που βρίσκονται γειτονικά η μία στην άλλη και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους είτε όταν αυτές είναι τροποποιημένες είτε όταν είναι ατροποιοίητες. Από τα αποτελέσματα αυτά βλέπουμε ότι η έλλειψη τροποποιήσεων και στις 2 ιστονικές ουρές έχει σαν αποτέλεσμα την σχεδόν αμελητέα αλληλεπίδραση μεταξύ των 2 ιστονών. Ενώ η τροποποίηση είτε της μία από τις 2 ιστονικές ουρές είτε και των δυο έχει σαν αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση αυτών όταν οδηγούμαστε σε συνθήκες όπου τα συστήματα είναι φορτισμένα. Στις περιπτώσεις όπου δεν έχουμε εμφάνιση φορτίου η αλληλεπίδραση αυτή εμφανίζεται σε μικρή έκταση.

Η μελέτη των παραπάνω συστημάτων της HP1 με την H3 έχει εστιαστεί κυρίως σε δομικά χαρακτηριστικά, καθώς και σε εύρεση των δεσμών υδρογόνου που εμφανίζονται σε διάφορες περιπτώσεις, με την μελέτη ενός σημαντικού αριθμού διαφόρων τροποποιήσεων. Με γνώμονα τα παραπάνω είναι δυνατόν να ερευνηθεί και μεγαλύτερος αριθμός από τροποποιήσεις και κατά πόσα επηρεάζουν την συμπεριφορά του συστήματος. Το γεγονός αυτό αφήνει ακόμη πολλά αναπάντητα ερωτήματα για χαρακτηριστικά τους που έχουν να κάνουν με ηλεκτρονιακά χαρακτηριστικά, κάτι που είναι εφικτό να μελετηθεί μελλοντικά με υπολογισμούς πρώτων αρχών στην περιοχή του κλωβού, που είναι και το κύριο σημείο σύνδεσης της ιστόνης με την HP1. Ακόμη με την βοήθεια των παραμέτρων που υλοποιήθηκαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή μπορεί να γίνει και μελέτη για πληθώρα συστημάτων στην βιολογία που περιέχουν τις προαναφερθείσες τροποποιήσεις. Τέλος με την βοήθεια της μεθοδολογίας που έχει αναπτυχθεί παραπάνω είναι δυνατόν να γίνει μελέτη και για άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, που παρουσιάζουν βιολογική σημασία.

Αναφορές

1. Kornberg, R.D., *Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA*. Science, 1974. **184**(4139): p. 868-871.
2. Oudet, P., M. Gross-Bellard, and P. Chambon, *Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit*. Cell, 1975. **4**(4): p. 281-300.
3. Victor Davidson, D.S., *BIOCHEMISTRY* Victor Davidson, Donald Sittman ed, ed. t. edition.
4. Dorigo, B., et al., *Chromatin Fiber Folding: Requirement for the Histone H4 N-terminal Tail*. Journal of Molecular Biology, 2003. **327**(1): p. 85-96.
5. Pennings, S., G. Meersseman, and E.M. Bradbury, *Linker histones H1 and H5 prevent the mobility of positioned nucleosomes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(22): p. 10275-10279.
6. Varga-Weisz, P.D. and P.B. Becker, *Transcription factor-mediated chromatin remodelling: mechanisms and models*. FEBS Letters, 1995. **369**(1): p. 118-121.
7. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8[thinsp]Å resolution*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 251-260.
8. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the Histone Code*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-1080.
9. Czermin, B., et al., *Drosophila Enhancer of Zeste/ESC Complexes Have a Histone H3 Methyltransferase Activity that Marks Chromosomal Polycomb Sites*. Cell, 2002. **111**(2): p. 185-196.
10. Talasz, H., et al., *Histone H4-Lysine 20 Monomethylation Is Increased in Promoter and Coding Regions of Active Genes and Correlates with Hyperacetylation*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(46): p. 38814-38822.
11. Vakoc, C.R., et al., *Histone H3 Lysine 9 Methylation and HPI[gamma] Are Associated with Transcription Elongation through Mammalian Chromatin*. Molecular Cell, 2005. **19**(3): p. 381-391.

12. Dialynas, G.K., et al., *Methylation-independent Binding to Histone H3 and Cell Cycle-dependent Incorporation of HP1 β into Heterochromatin*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(20): p. 14350-14360.
13. Dion, M.F., et al., *Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(15): p. 5501-5506.
14. Henikoff, S., *Histone modifications: Combinatorial complexity or cumulative simplicity?* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(15): p. 5308-5309.
15. Cowell, I., et al., *Heterochromatin, HP1 and methylation at lysine 9 of histone H3 in animals*. Chromosoma, 2002. **111**(1): p. 22-36.
16. Bienz, M., *The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain*. Trends in Biochemical Sciences, 2006. **31**(1): p. 35-40.
17. Ball, L.J., et al., *Structure of the chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein 1*. EMBO J, 1997. **16**(9): p. 2473-2481.
18. DANIEL, et al., *Effector proteins for methylated histones: An expanding family*. Vol. 4. 2005, Georgetown, TX, ETATS-UNIS: Landes Bioscience. 8.
19. Fischle, W., Y. Wang, and C. David Allis, *Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond*. Nature, 2003. **425**(6957): p. 475-479.
20. Kellum, R. and B. Alberts, *Heterochromatin protein 1 is required for correct chromosome segregation in Drosophila embryos*. J Cell Sci, 1995. **108**(4): p. 1419-1431.
21. Minc, E., et al., *Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells*. Chromosoma, 1999. **108**(4): p. 220-234.
22. Reute, G. and P. Spierer, *Position effect variegation and chromatin proteins*. BioEssays, 1992. **14**(9): p. 605-612.
23. Hirota, T., et al., *Histone H3 serine[thinsp]10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin*. Nature, 2005. **438**(7071): p. 1176-1180.
24. Eissenberg, J.C., et al., *Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in Drosophila melanogaster*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990. **87**(24): p. 9923-9927.

25. James, T.C. and S.C. Elgin, *Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in Drosophila melanogaster and its gene*. Mol. Cell. Biol., 1986. **6**(11): p. 3862-3872.
26. Paro, R. and D.S. Hogness, *The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of Drosophila*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(1): p. 263-267.
27. Maison, C. and G. Almouzni, *HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(4): p. 296-305.
28. Singh, P.B. and S.D. Georgatos, *HP1: Facts, open questions, and speculation*. Journal of Structural Biology, 2002. **140**(1-3): p. 10-16.
29. Brasher, S.V., et al., *The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer*. EMBO J, 2000. **19**(7): p. 1587-1597.
30. Cowieson, N.P., et al., *Dimerisation of a chromo shadow domain and distinctions from the chromodomain as revealed by structural analysis*. Current Biology, 2000. **10**(9): p. 517-525.
31. Cheutin, T., et al., *Maintenance of Stable Heterochromatin Domains by Dynamic HP1 Binding*. Science, 2003. **299**(5607): p. 721-725.
32. Peters, A.H.F.M., et al., *Loss of the Suv39h Histone Methyltransferases Impairs Mammalian Heterochromatin and Genome Stability*. Cell, 2001. **107**(3): p. 323-337.
33. Schotta, G., et al., *Central role of Drosophila SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing*. EMBO J, 2002. **21**(5): p. 1121-1131.
34. Bannister, A.J., et al., *Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 120-124.
35. Jacobs, S.A. and S. Khorasanizadeh, *Structure of HP1 Chromodomain Bound to a Lysine 9-Methylated Histone H3 Tail*. Science, 2002. **295**(5562): p. 2080-2083.
36. Lachner, M., et al., *Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 116-120.
37. Nakayama, J.-i., et al., *Role of Histone H3 Lysine 9 Methylation in Epigenetic Control of Heterochromatin Assembly*. Science, 2001. **292**(5514): p. 110-113.

38. Ringrose, L., H. Ehret, and R. Paro, *Distinct Contributions of Histone H3 Lysine 9 and 27 Methylation to Locus-Specific Stability of Polycomb Complexes*. *Molecular Cell*, 2004. **16**(4): p. 641-653.
39. Danzer, J.R. and L.L. Wallrath, *Mechanisms of HP1-mediated gene silencing in Drosophila*. *Development*, 2004. **131**(15): p. 3571-3580.
40. Greil, F., et al., *Distinct HP1 and Su(var)3-9 complexes bind to sets of developmentally coexpressed genes depending on chromosomal location*. *Genes & Development*, 2003. **17**(22): p. 2825-2838.
41. Huang, D.W., et al., *Distinct Cytoplasmic and Nuclear Fractions of Drosophila Heterochromatin Protein 1: Their Phosphorylation Levels and Associations with Origin Recognition Complex Proteins*. *The Journal of Cell Biology*, 1998. **142**(2): p. 307-318.
42. Maison, C., et al., *Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component*. *Nat Genet*, 2002. **30**(3): p. 329-334.
43. Muchardt C, G.M., Seeler JS, Trouche D, Dejean A, Yaniv M, *Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1alpha*. *EMBO Rep* 3(10):975-81, 2002
44. Prasanth, S.G., et al., *Human Orc2 localizes to centrosomes, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance*. *EMBO J*, 2004. **23**(13): p. 2651-2663.
45. Quivy, J.-P., et al., *A CAF-1 dependent pool of HP1 during heterochromatin duplication*. *EMBO J*, 2004. **23**(17): p. 3516-3526.
46. Fan, J.Y., et al., *H2A.Z Alters the Nucleosome Surface to Promote HP1±-Mediated Chromatin Fiber Folding*. 2004. **16**(4): p. 655-661.
47. Nielsen, A.L., et al., *Heterochromatin Formation in Mammalian Cells: Interaction between Histones and HP1 Proteins*. 2001. **7**(4): p. 729-739.
48. Perrini, B., et al., *HP1 Controls Telomere Capping, Telomere Elongation, and Telomere Silencing by Two Different Mechanisms in Drosophila*. 2004. **15**(3): p. 467-476.
49. Ainsztein, A.M., et al., *INCENP Centromere and Spindle Targeting: Identification of Essential Conserved Motifs and Involvement of Heterochromatin Protein HP1*. *The Journal of Cell Biology*, 1998. **143**(7): p. 1763-1774.

50. Eissenberg, J.C., Y.W. Ge, and T. Hartnett, *Increased phosphorylation of HP1, a heterochromatin-associated protein of Drosophila, is correlated with heterochromatin assembly*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(33): p. 21315-21321.
51. Allinger, N.L., *Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms*. Journal of the American Chemical Society, 1977. **99**(25): p. 8127-8134.
52. Allinger N.L., B.U., *Molecular Mechanics*. 1982, An American Chemical Society Publication.
53. J. T. Sprague, J.C.T., Y. Yuh and N. L. Allinger, *The MMP2 Computational Method*, J. Comput. Chem, 1987. **8**: p. 581-603.
54. Allinger, N.L., R.A. Kok, and M.R. Imam, *Hydrogen bonding in MM2*. Journal of Computational Chemistry, 1988. **9**(6): p. 591-595.
55. Allinger, N.L., et al., *Structures of norbornane and dodecahedrane by molecular mechanics calculations (MM3), x-ray crystallography, and electron diffraction*. Journal of the American Chemical Society, 1989. **111**(3): p. 1106-1114.
56. Allinger, N.L., Y.H. Yuh, and J.H. Lii, *Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 1*. Journal of the American Chemical Society, 1989. **111**(23): p. 8551-8566.
57. Lii, J.H. and N.L. Allinger, *Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 2. Vibrational frequencies and thermodynamics*. Journal of the American Chemical Society, 1989. **111**(23): p. 8566-8575.
58. Lii, J.H. and N.L. Allinger, *Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 3. The van der Waals' potentials and crystal data for aliphatic and aromatic hydrocarbons*. Journal of the American Chemical Society, 1989. **111**(23): p. 8576-8582.
59. Allinger, N.L., F. Li, and L. Yan, *Molecular mechanics. The MM3 force field for alkenes*. Journal of Computational Chemistry, 1990. **11**(7): p. 848-867.
60. III, T.E.C. and M.A. Young, *Molecular dynamics simulation of nucleic acids: Successes, limitations, and promise*. Biopolymers, 2000. **56**(4): p. 232-256.
61. MacKerel, A.D., et al., *{CHARMM}: The Energy Function and Its Parameterization with an Overview of the Program*, Schleyer, Editor. 1998, John Wiley & Sons: Chichester. p. 271-277.

62. Jr., A.D.M., N. Banavali, and N. Foloppe, *Development and current status of the CHARMM force field for nucleic acids*. *Biopolymers*, 2000. **56**(4): p. 257-265.
63. Ponder, J.W. and D.A. Case, *Force Fields for Protein Simulations*, in *Advances in Protein Chemistry*, D. Valerie, Editor. 2003, Academic Press. p. 27-85.
64. Case, D.A., et al., *The Amber biomolecular simulation programs*. *Journal of Computational Chemistry*, 2005. **26**(16): p. 1668-1688.
65. Bayly, C.I., et al., *A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model*. *The Journal of Physical Chemistry*, 1993. **97**(40): p. 10269-10280.
66. Cornell, W.D., et al., *Application of RESP charges to calculate conformational energies, hydrogen bond energies, and free energies of solvation*. *Journal of the American Chemical Society*, 1993. **115**(21): p. 9620-9631.
67. Cieplak, P., et al., *Application of the multimolecule and multiconformational RESP methodology to biopolymers: Charge derivation for DNA, RNA, and proteins*. *Journal of Computational Chemistry*, 1995. **16**(11): p. 1357-1377.
68. Besler, B.H., K.M. Merz, and P.A. Kollman, *Atomic charges derived from semiempirical methods*. *J. Comput. Chem.*, 1990. **11**(4): p. 431-439.
69. McCammon, J.A., B.R. Gelin, and M. Karplus, *Dynamics of folded proteins*. *Nature*, 1977. **267**(5612): p. 585-590.
70. Karplus, M. and J.A. McCammon, *Molecular dynamics simulations of biomolecules*. *Nat Struct Mol Biol*, 2002. **9**(9): p. 646-652.
71. Artymiuk, P.J., et al., *Crystallographic studies of the dynamic properties of lysozyme*. *Nature*, 1979. **280**(5723): p. 563-568.
72. Frauenfelder, H., G.A. Petsko, and D. Tsernoglou, *Temperature-dependent X-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics*. *Nature*, 1979. **280**(5723): p. 558-563.
73. T. Ichize, M.K., *Biochemistry* 22, 1983: p. 2884-2893.
74. Dobson, C.M.K., M., *Methods in Enzymol*, 1986(131): p. 362-389.
75. Smith J, C.S., Pezzeca U, Brooks BR, an Karplus M., *J. Chem. Phys.*, 1986(85): p. 3636-3654
76. Frauenfelder, H., Hartmann, H., Karplus, M., Kuntz, I. D., K. Jr., J., Parak, F., Petsko, G. A., Ringe, D., Tilton,, and J. R. F., Connolly, M. L. & Nelson, M., *Biochemistry* 26, 1987: p. 254-261.

77. Harvey, S., et al., *Phenylalanine transfer RNA: molecular dynamics simulation*. Science, 1984. **223**(4641): p. 1189-1191.
78. Case, D.A. and M. Karplus, *Dynamics of ligand binding to heme proteins*. Journal of Molecular Biology, 1979. **132**(3): p. 343-368.
79. Irikura KK, T.B., Brooks BR, Karplus M., *Transition from B to Z DNA: contribution of internal fluctuations to the configurational entropy difference*. Science 1985. **229**: p. 571-572
80. Adcock, S.A. and J.A. McCammon, *Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins*. Chemical Reviews, 2006. **106**(5): p. 1589-1615.
81. Karplus, M. and J. Kuriyan, *Molecular dynamics and protein function*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(19): p. 6679-6685.
82. Verlet, L., *{Computer "Experiments" on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules}*. Physical Review Online Archive (Prola), 1967. **159**(1): p. 98.
83. Charles L. Brooks, M.K., and B. Montgomery Pettitt, *Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure, and Thermodynamics* wiley,USA, ed. U. wiley. 1988.
84. Schlick, a., *Molecular Modeling and Simulation*. Springer-Verlag,New york. N.y. Springer-Verlag. 2002.
85. Schlick, T., *Molecular Modeling and Simulation*. 2002: Springer-verlag, New-York.
86. Deserno, M.H., Christian, *How to mesh up Ewald sums. I. A theoretical and numerical comparison of various particle mesh routines*. J. Chem. Phys., 1998. **109**: p. 7678-7693.
87. Kutzner, C., *Towards an efficient implementation of the Particle-Mesh-Ewald (PME) method on low-bandwidth linux clusters*. Max-Planck-Institute for Biophysical Chemistry Theoretical and Computational Biophysics Department Göttingen, 2005.
88. R.W. Hockney and J.W. Eastwood, *Computer simulation using particles*. McGraw-Hill, ed. McGraw-Hill. 1988: McGraw-Hill.
89. Frank H. Stillinger, A.R., *Improved simulation of liquid water by molecular dynamics*. J. Chem. Phys., 1974(60): p. 1545.

90. Jorgensen, W.L., *Quantum and statistical mechanical studies of liquids. 10. Transferable intermolecular potential functions for water, alcohols, and ethers. Application to liquid water.* Journal of the American Chemical Society, 1981. **103**(2): p. 335-340.
91. Jorgensen, W.L., *Revised TIPS for simulations of liquid water and aqueous solutions.* J. Chem. Phys., 1982. **77**: p. 4156.
92. H.J.C. Berendsen, J.P.M.P., W.F. van Gunsteren and J. Hermans. In: B. Pullman, *Intermolecular forces.* 1981: Reidel, Dordrecht.
93. William L. Jorgensen, J.C., Jeffrey D. Madura¹, Roger W. Impey, and Michael L. Klein *Comparison of simple potential functions for simulating liquid water.* J. Chem. Phys., 1983. **79**: p. 926.
94. Berendsen, H.J.C., J.R. Grigera, and T.P. Straatsma, *The missing term in effective pair potentials.* The Journal of Physical Chemistry, 1987. **91**(24): p. 6269-6271.
95. J. D. Bernal, R.H.F., *A Theory of Water and Ionic Solution, with Particular Reference to Hydrogen and Hydroxyl Ions.* J. Chem. Phys., 1933. **1**: p. 515.
96. Mahoney, M.W.J., William L., *A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions.* J. Chem. Phys., 2000. **112**(20): p. 8910-8922.
97. Eerden, H.N.a.J.P.J.M.v.d., *An intermolecular potential model for the simulation of ice and water near the melting point: A six-site model of H₂O.* J. Chem. Phys., 2003. **118**: p. 7401.
98. Kuo, I.F.W., et al., *Time-Dependent Properties of Liquid Water: A Comparison of Car–Parrinello and Born–Oppenheimer Molecular Dynamics Simulations.* Journal of Chemical Theory and Computation, 2006. **2**(5): p. 1274-1281.
99. Jackson, J.D., *Classical Electrodynamics.* 1975: John Wiley, New York.
100. Richards, F.M., *Areas, Volumes, Packing, and Protein Structure.* Annual Review of Biophysics and Bioengineering, 2003. **6**(1): p. 151-176.
101. Holtzer, A., *The 'ldquocratic correctionrdquo and related fallacies.* Biopolymers, 1995. **35**(6): p. 595-602.
102. Cummings, M.D., R.J. Read, and T.N. Hart, *Atomic solvation parameters in the analysis of protein-protein docking results.* Protein Science, 1995. **4**(10): p. 2087-2099.

103. Honig B, N.A., *Classical electrostatics in biology and chemistry*. Science, 1995. **268**(5214): p. 1144.
104. Zhu, J., Y. Shi, and H. Liu, *Parametrization of a Generalized Born/Solvent-Accessible Surface Area Model and Applications to the Simulation of Protein Dynamics*. The Journal of Physical Chemistry B, 2002. **106**(18): p. 4844-4853.
105. Im, W., M.S. Lee, and C.L.B. III, *Generalized born model with a simple smoothing function*. Journal of Computational Chemistry, 2003. **24**(14): p. 1691-1702.
106. Cheatham TE 3rd, C.P., Kollman PA., *A modified version of the Cornell et al. force field with improved sugar pucker phases and helical repeat*. J Biomol Struct Dyn, 1999. **16**(4): p. 845-62.
107. Cornell, W.D., et al., *A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules*. Journal of the American Chemical Society, 1995. **117**(19): p. 5179-5197.
108. Wang, J., P. Cieplak, and P. Kollman, *How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules?* Journal of Computational Chemistry, 2000. **21**(12): p. 1049-1074.
109. Cieplak, P., et al., *Application of the multimolecule and multiconformational RESP methodology to biopolymers: Charge derivation for DNA, RNA, and proteins*. Journal of Computational Chemistry, 1995. **16**(11): p. 1357-1377.
110. Frisch, M.J.T., G. W.; Schlegel, H. B.; Gill, P. M. W.; Johnson, B. G.; Robb, J. A.; Cheeseman, J. R.; Keith, T. A.; Petersson, G. A. Montgomery, J. A.; Raghavachari, K.; Al-Laham, M. A.; Zakrzewski, V. G.; Ortiz, J. V.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Peng, C. Y.; Ayala, P. Y.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Replogle, E. S.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Binkley, J. S.; Defrees, D. J.; Baker, J.; Stewart, J. P.; Head-Gordon, M.; Gonzalez, C.; Pople, J. A., *Gaussian 98(Revision A.9)*, P. Inc.: Pittsburgh, Editor. 1998.
111. <http://ambermd.org/#AmberTools>.
112. D.A. Case, T.A.D., T.E. Cheatham, III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R., et al., *AMBER 9*, University of California and S. Francisco., Editors. 2006.

113. Scott E. Feller, Y.Z., Richard W. Pastor, and Bernard R. Brooks *Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method*. J. Chem Phys., 1995. **103**: p. 4613.
114. Ramachandran, G.N., C. Ramakrishnan, and V. Sasisekharan, *Stereochemistry of polypeptide chain configurations*. Journal of molecular biology, 1963. **7**: p. 95-99.
115. Goldberg, A.D., C.D. Allis, and E. Bernstein, *Epigenetics: A Landscape Takes Shape*. Cell, 2007. **128**(4): p. 635-638.
116. Rea, S., et al., *Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases*. Nature, 2000. **406**(6796): p. 593-599.
117. Garcia, B.A., et al., *Modifications of Human Histone H3 Variants during Mitosis†*. Biochemistry, 2005. **44**(39): p. 13202-13213.
118. Fischle, W., et al., *Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation*. Nature, 2005. **438**(7071): p. 1116-1122.
119. Bannister, A.J. and T. Kouzarides, *Reversing histone methylation*. Nature, 2005. **436**(7054): p. 1103-1106.
120. Jiang, Y., et al., *Dynamics simulation on the flexibility and backbone motions of HP1 chromodomain bound to free and lysine 9-methylated histone H3 tails*. International Journal of Quantum Chemistry, 2009. **109**(5): p. 1135-1147.
121. Jiang, Y.K., et al., *Molecular dynamics simulation on HP1 protein binding by histone H3 tail methylation and phosphorylation*. International Journal of Quantum Chemistry, 2009. **109**(4): p. 746-755.
122. Liu, H. and Y. Duan, *Effects of Posttranslational Modifications on the Structure and Dynamics of Histone H3 N-Terminal Peptide*. Biophysical Journal, 2008. **94**(12): p. 4579-4585.
123. Machado, M., P. Dans, and S. Pantano, *Isoform-specific determinants in the HP1 binding to histone 3: insights from molecular simulations*. Amino Acids, 2010. **38**(5): p. 1571-1581.
124. Nielsen, P.R., et al., *Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9*. Nature, 2002. **416**(6876): p. 103-107.
125. Jacobs, S.A., Khorasanizadeh, S., *Chromodomain Of HP1 Complexed With Histone H3 Tail Containing monomethyllysine 9*. To be Published.

126. Craft, J. and G. Legge, *An AMBER/DYANA/MOLMOL Phosphorylated Amino Acid Library Set and Incorporation into NMR Structure Calculations*. Journal of Biomolecular NMR, 2005. **33**(1): p. 15-24.
127. Riemen, A.J. and M.L. Waters, *Dueling Post-Translational Modifications Trigger Folding and Unfolding of a β -Hairpin Peptide*. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(26): p. 9007-9013.
128. Cheung, P., C.D. Allis, and P. Sassone-Corsi, *Signaling to Chromatin through Histone Modifications*. Cell, 2000. **103**(2): p. 263-271.
129. Rogakou, E.P., et al., *DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(10): p. 5858-5868.
130. Crowe, S.L., et al., *Rapid phosphorylation of histone H2A.X following ionotropic glutamate receptor activation*. European Journal of Neuroscience, 2006. **23**(9): p. 2351-2361.
131. Shoemaker, C.B. and R. Chalkley, *An H3 histone-specific kinase isolated from bovine thymus chromatin*. Journal of Biological Chemistry, 1978. **253**(16): p. 5802-5807.
132. De Souza, C.P.C., et al., *Mitotic Histone H3 Phosphorylation by the NIMA Kinase in Aspergillus nidulans*. Cell, 2000. **102**(3): p. 293-302.
133. Hake, S.B., et al., *Serine 31 phosphorylation of histone variant H3.3 is specific to regions bordering centromeres in metaphase chromosomes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(18): p. 6344-6349.
134. Hendzel, M.J., et al., *Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation*. Chromosoma, 1997. **106**(6): p. 348-360.
135. Bedford, M.T. and S. Richard, *Arginine Methylation: An Emerging Regulator of Protein Function*. Molecular cell, 2005. **18**(3): p. 263-272.
136. Dormeyer, W., M. Ott, and M. Schnölzer, *Probing Lysine Acetylation in Proteins*. Molecular & Cellular Proteomics, 2005. **4**(9): p. 1226-1239.
137. Kawasaki, H., et al., *ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation*. Nature, 2000. **405**(6783): p. 195-200.

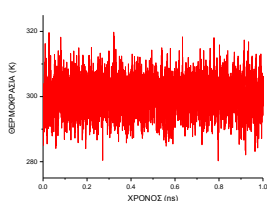
138. Markaki, Y., et al., *Phosphorylation of histone H3 at Thr3 is part of a combinatorial pattern that marks and configures mitotic chromatin*. J Cell Sci, 2009. **122**(16): p. 2809-2819.
139. Woods, A.S. and S. Ferré, *Amazing Stability of the Arginine–Phosphate Electrostatic Interaction*. Journal of Proteome Research, 2005. **4**(4): p. 1397-1402.

Παράρτημα Α

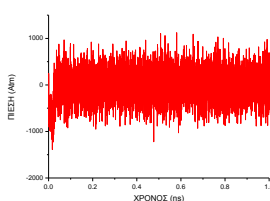
Διαγράμματα ενέργειας, πίεσης και θερμοκρασίας σε συνάρτηση με το χρόνο.

Στην παράγραφο 3.2.1 παρουσιάζεται ο τρόπος με τον οποίο έγινε η ελαχιστοποίηση και η προσομοίωση μοριακής δυναμικής για τις περιπτώσεις των 7 τροποποιημένων αμινοξέων καθώς επίσης και για τα ατροποποίητα που χρησιμοποιήθηκαν ως σημείο αναφοράς. Κατά την μοριακή δυναμική ένδειξη για σωστή λειτουργία των παραμέτρων παίρνουμε από την σταθερότητα των διαγραμμάτων της συνολικής ενέργειας, της πίεσης και της θερμοκρασίας σε συνάρτηση με το χρόνο. Στην ενότητα αυτή παρουσιάζουμε τα διαγράμματα αυτά για όλες τις περιπτώσεις που πραγματοποιήσαμε προσομοίωση.

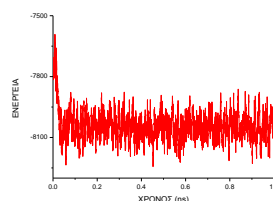
1) Διμεθυλιωμένη Λυσίνη



α) Θερμοκρασία

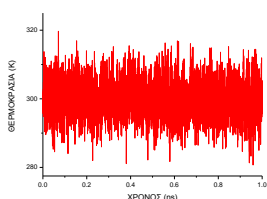


β) Πίεση

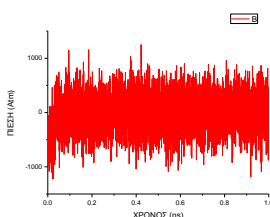


γ) Ενέργεια

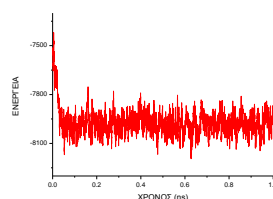
2) Τριμεθυλιωμένη Λυσίνη



α) Θερμοκρασία

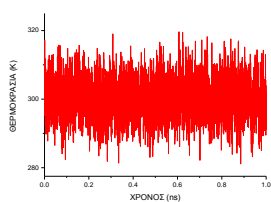


β) Πίεση

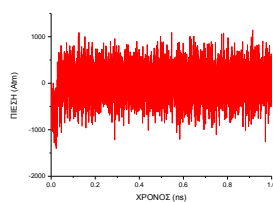


γ) Ενέργεια

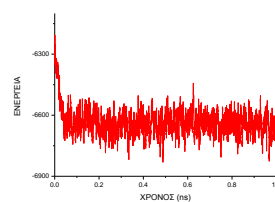
3) Ακετυλιωμένη Λυσίνη



α) Θερμοκρασία

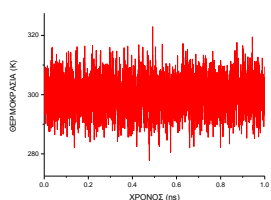


β) Πίεση

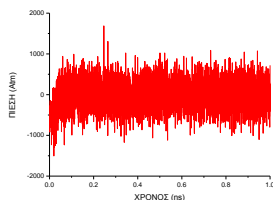


γ) Ενέργεια

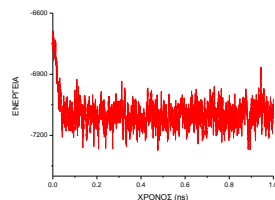
4) Ατροποποίητη Λυσίνη



α) Θερμοκρασία

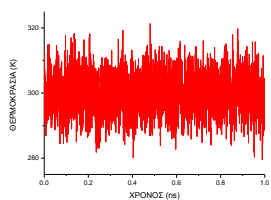


β) Πίεση

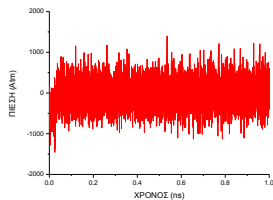


γ) Ενέργεια

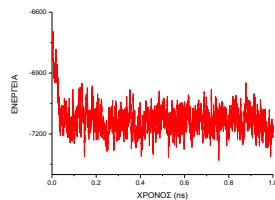
5) Ατροποποίητη Αργινίνη



α) Θερμοκρασία

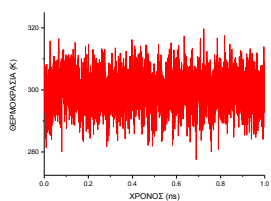


β) Πίεση

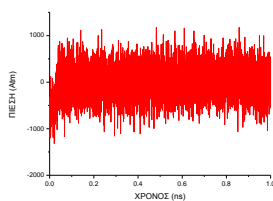


γ) Ενέργεια

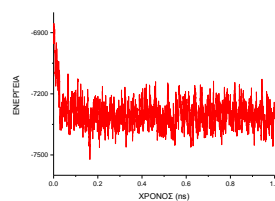
6) Μεθυλιωμένη Αργινίνη



α) Θερμοκρασία

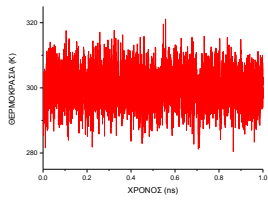


β) Πίεση

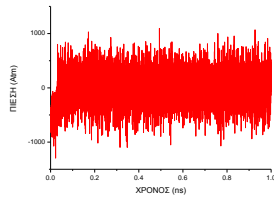


γ) Ενέργεια

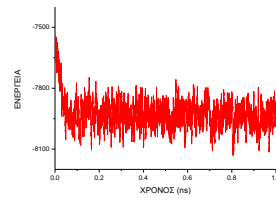
7) Ασύμμετρα Διμεθυλιωμένη Αργινίνη



α) Θερμοκρασία

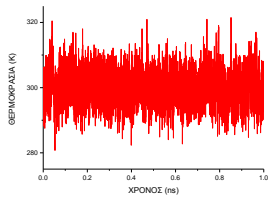


β) Πίεση

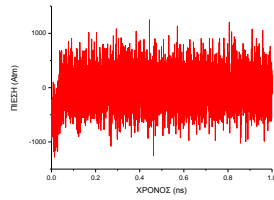


γ) Ενέργεια

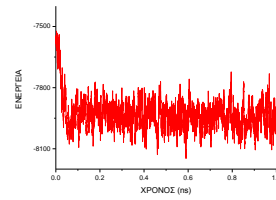
8) Συμμετρικά Διμεθυλιωμένη Αργινίνη



α) Θερμοκρασία



β) Πίεση



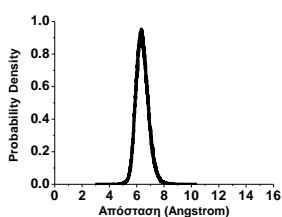
γ) Ενέργεια

Παράρτημα Β

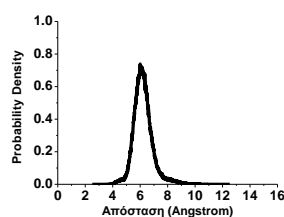
Αποστάσεις μεταξύ αρωματικών δακτυλίων

Στο κεφάλαιο 4 μελετάμε το σύστημα της HP1 με την H3 για διάφορες τροποποιήσεις της H3. Σε αυτή την ενότητα θα παραθέσουμε τις γραφικές παραστάσεις των αποστάσεων μεταξύ των κέντρων των αρωματικών δακτυλίων που σχηματίζουν το κλωβό κατά την προσομοίωση μοριακής δυναμικής. Τα διαγράμματα αυτά παρέχουν μια ποσοτική εικόνα της σταθερότητας του κλωβού μίας και η αποστάσεις μεταξύ των τριών δακτυλίων μεταβάλλονται ελάχιστα γύρω από μια σταθερή τιμή.

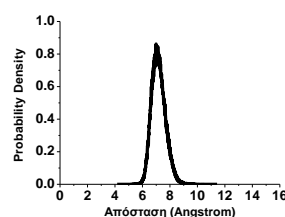
1) Μονομεθυλίωση της λυσίνης 9 της ιστόνης H3



A) TYR3-TRP45

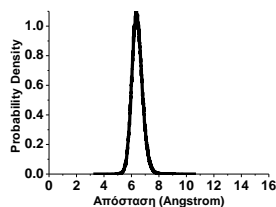


B) TYR3-TYR48

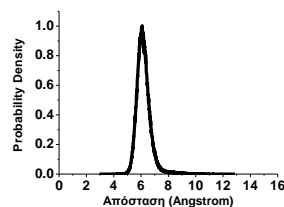


Γ) TRP45-TYR48

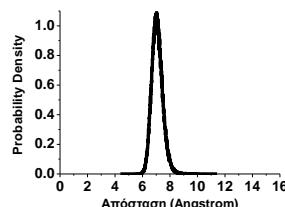
2) Διμεθυλίωση της λυσίνης 9 της ιστόνης H3



A) TYR3-TRP45

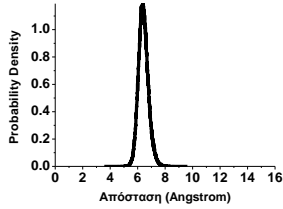


B) TYR3-TYR48

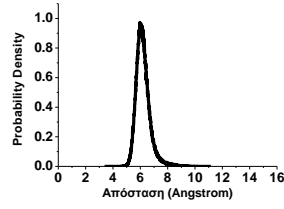


Γ) TRP45-TYR48

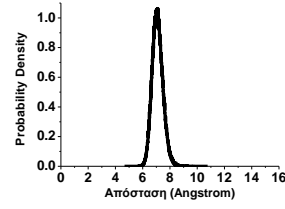
3) Τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 της ιστόνης H3



A) TYR3-TRP45

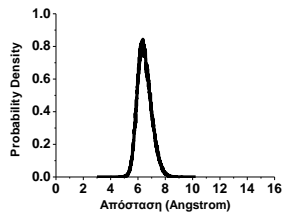


B) TYR3-TYR48

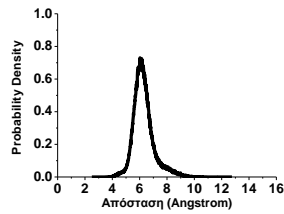


Γ) TRP45-TYR48

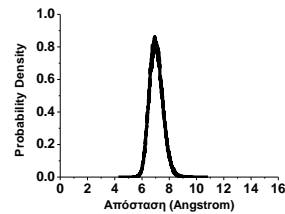
4) Μονομεθυλίωση της λυσίνης 9 και φωσφορυλίωση της σερίνης της ιστόνης H3



A) TYR3-TRP45

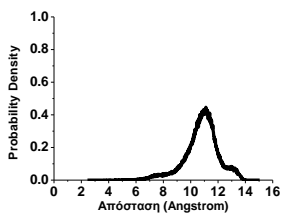


B) TYR3-TYR48

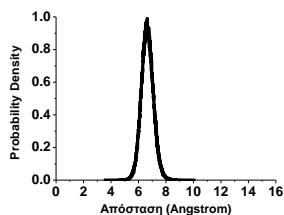


Γ) TRP45-TYR48

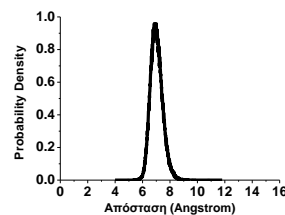
5) Διμεθυλίωση της λυσίνης 9 και φωσφορυλίωση της σερίνης της ιστόνης H3



A) TYR3-TRP45

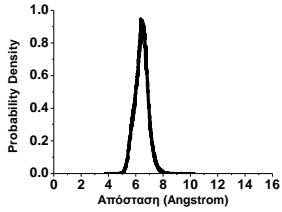


B) TYR3-TYR48

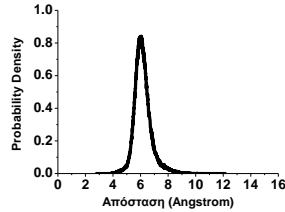


Γ) TRP45-TYR48

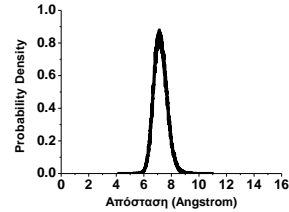
6) Τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 και φωσφορυλίωση της σερίνης της ιστόνης H3



A) TYR3-TRP45

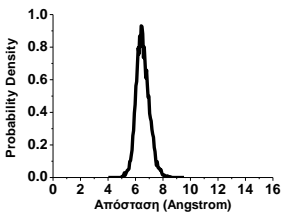


B) TYR3-TYR48

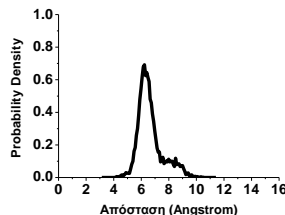


Γ) TRP45-TYR48

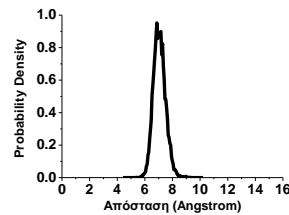
7) Διμεθυλίωση της αργινίνης 8, μονομεθυλίωση της λυσίνης 9 και φωσφορυλίωση της σερίνης 10 της ιστόνης H3.



A) TYR3-TRP45

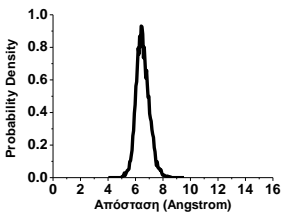


B) TYR3-TYR48

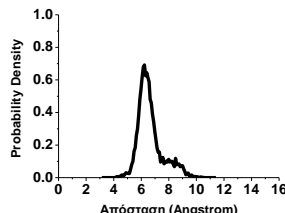


Γ) TRP45-TYR48

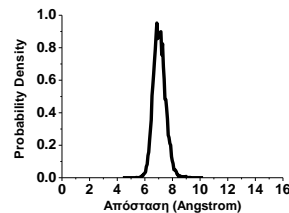
8) Διμεθυλίωση της αργινίνης 8, τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 και φωσφορυλίωση της σερίνης 10 της ιστόνης H3.



A) TYR3-TRP45

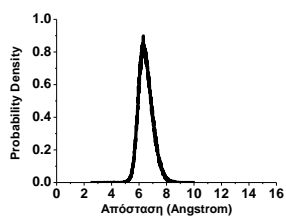


B) TYR3-TYR48

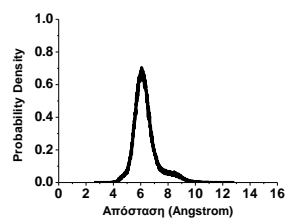


Γ) TRP45-TYR48

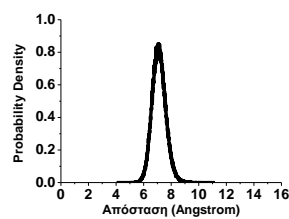
9) Υποκατάσταση της αργινίνης 8 σε γλυκίνη 8, μονομεθυλίωση της λυσίνης 9 και φωσφορυλίωση της σερίνης 10 της ιστόνης H3.



A) TYR3-TRP45

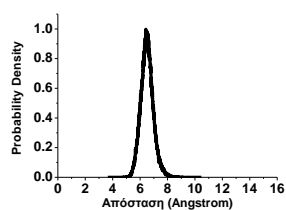


B) TYR3-TYR48

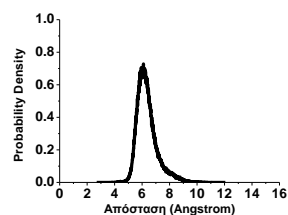


Γ) TRP45-TYR48

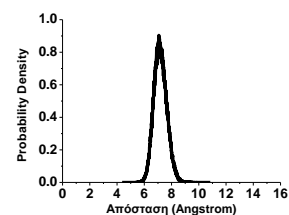
10) Υποκατάσταση της αργινίνης 8 σε γλυκίνη 8, τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 και φωσφορυλίωση της σερίνης 10 της ιστόνης H3.



A) TYR3-TRP45



B) TYR3-TYR48



Γ) TRP45-TYR48

Παράρτημα Γ

Συντομογραφίες αμινοξέων

Όνομασία	Διεθνής σύντμηση (3 γράμματα)	Διεθνής σύντμηση (1 γράμμα)
Αλανίνη	Ala	A
Αργινίνη	Arg	R
Ασπαραγίνη	Asn	N
Ασπαργανικό οξύ	Asp	D
Κυστεΐνη	Cys	C
Γλουταμίνη	Gln	Q
Γλουταμικό οξύ	Glu	E
Γλυκίνη	Gly	G
Ιστιδίνη	His	H
Ισολευκίνη	Ile	I
Λευκίνη	Leu	L
Λυσίνη	Lys	K
Μεθιονίνη	Met	M
Φαινυλαλανίνη	Phe	F
Προλίνη	Pro	P
Σερίνη	Ser	S
Θρεονίνη	Thr	T
Τρυπτοφάνη	Trp	W
Τυροσίνη	Tyr	Y
Βαλίνη	Val	V